



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE
SAN NICOLÁS DE HIDALGO**



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO BIOLÓGICAS

**Evaluación de la actividad de enzimas líticas de *Bacillus*
sp. UM96 y su capacidad de biocontrol en hongos
fitopatógenos**

Tesis que presenta

Sofía Carolina Martínez Absalón

para obtener el grado de Maestra en Ciencias en Biología

Experimental

Asesor: Doctor en Ciencias Biomédicas Gustavo Santoyo Pizano

Morelia Mich. Diciembre 2013



**Laboratorio de Recombinación
y Diversidad Genómica
IQB-UMSNH**

RESUMEN

En este trabajo se identificó a la cepa *Bacillus* sp. UM96 como parte de la especie *B. thuringiensis* de acuerdo con la secuenciación completa del gen de ADNr 16S y por la presencia del cuerpo paraesporal característico de esta especie. El gen *cry*, que codifican el cuerpo paraesporal, se amplificó del genoma de *B. thuringiensis* UM96. Además, presentó el gen putativo de endoquitinasas *chi*. Los sobrenadantes de *B. thuringiensis* UM96 obtenidos a partir de caldo nutritivo (CN) y de un medio mínimo con quitina como única fuente de carbono (MQ), mostraron actividad de quitinasa, siendo mayor en el sobrenadante MQ. Por otra parte ambos sobrenadantes mostraron actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, la cual fue similar a la que presentó la quitinasa pura comercial. Además, ambos sobrenadantes incubados a 60 °C perdieron la actividad antifúngica. El sobrenadante MQ presentó mayor actividad antifúngica en comparación al sobrenadante CN. Interesantemente, *B. thuringiensis* UM96 mostró capacidad de colonización de la rizósfera en plantas de maíz. Finalmente, *B. thuringiensis* UM96 logró suprimir la infección de *B. cinerea* en plantas de *Medicago truncatula* de manera significativa con respecto a las plantas control sin ningún tratamiento. Así, *B. thuringiensis* UM96 mostró tener un gen putativo del grupo *cry1A*, y un gen *chi* que codifica posiblemente una endoquitinasa, además, se encontró actividad de quitinasa que podría estar relacionada en la capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96. Con todo esto, *B. thuringiensis* UM96 mostró altas posibilidades para ser utilizada como biocontroladora de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, actividad de quitinasa, biocontrol.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. La rizósfera	1
2. Interacciones planta-microorganismo	1
3. Promoción de crecimiento vegetal por bacterias	3
3.1. Mecanismos directos	3
3.2. Mecanismos indirectos	5
4. Producción de enzimas líticas en bacterias rizosféricas	7
4.1. Glucanasas	7
4.2. Celulasas	10
4.3. Quitinasas	11
5. El género <i>Bacillus</i> como promotor del crecimiento vegetal	13
6. Generalidades de la especie <i>Bacillus thuringiensis</i>	14
7. <i>B. thuringiensis</i> y la importancia de los genes <i>cry</i>	15
8. Características generales del hongo fitopatógeno <i>Botrytis cinérea</i>	18
ANTECEDENTES	19
1. Especies de <i>B. thuringiensis</i> como antagonistas de hongos fitopatógenos	19
2. <i>B. thuringiensis</i> presenta actividades líticas	21
3. Aislamiento de la cepa antifúngica <i>Bacillus</i> sp. UM96	25
JUSTIFICACIÓN	28

HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Caracterización molecular de <i>Bacillus</i> sp. UM96	30
1.2. Amplificación del gen de ADNr 16S de <i>Bacillus</i> sp. UM96	30
1.3. Secuenciación de gen de ADNr 16S de <i>Bacillus</i> sp. UM96	31
1.4. Análisis de homología y construcción de árboles filogenéticos	31
1.5. Amplificación del gen <i>cry</i> de <i>Bacillus</i> sp. UM96	32
2. Caracterización fenotípica	33
3. Análisis de los mecanismos de la cepa UM96 para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógeno	34
3.1. Amplificación del gen <i>chi</i> de la cepa UM96	34
3.2. Caracterización de actividad de enzimas líticas	35
3.3. Comparación de la actividad antifúngica del sobrenadante de la cepa UM96 con quitinasa pura	37
4. Ensayo de colonización de la rizósfera de maíz por la cepa UM96	37
5. Análisis de la capacidad de biocontrol de la cepa UM96	39
5.1. Condiciones de crecimiento de las plantas	39
5.2. Ensayo de biocontrol de la cepa UM96	40
6. Estadística	41
RESULTADOS	42

1. Identificación de la cepa UM96	42
1.1. Análisis de la secuencia del gen de ADNr 16S	42
1.2. Caracterización del cuerpo paraesporal de la cepa UM96	45
1.3. Presencia de genes <i>cry</i> en <i>B. thuringiensis</i> UM96	47
2. Mecanismos de <i>B. thuringiensis</i> UM96 para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos	48
2.1. Amplificación del gen <i>chi</i> de endoquitinasas en <i>B. thuringiensis</i> UM96	48
2.2. Actividad de la actividad de enzimas líticas en <i>B. thuringiensis</i> UM96	50
2.3. Actividad antifúngica del sobrenadante de <i>B. thuringiensis</i> UM96	52
3. Capacidad de biocontrol de <i>B. thuringiensis</i> UM96	55
3.1. <i>B. thuringiensis</i> UM96 puede colonizar la rizósfera de plantas de maíz	55
3.2. <i>B. thuringiensis</i> UM96 muestra capacidad de biocontrol del hongo <i>B. cinérea</i> en plantas de <i>M. truncatula</i>	57
DISCUSIÓN	61
1. Determinación de <i>Bacillus</i> sp. UM96 como una especie de <i>Bacillus thuringiensis</i>	61
2. Mecanismo de inhibición de hongos fitopatógenos en <i>B. thuringiensis</i> UM96	64
2.1. <i>B. thuringiensis</i> UM96 contiene un gen <i>chi</i> de endoquitinasas	64
2.2. <i>B. thuringiensis</i> UM96 presentó actividad de quitinasas	65
2.3. La actividad de quitinasa de <i>B. thuringiensis</i> UM96 podría estar involucrada en su actividad de inhibición de hongos fitopatógenos	66
3. Interacciones de <i>B. thuringiensis</i> UM96 en la rizósfera	68
3.1. <i>B. thuringiensis</i> UM96 coloniza la rizósfera de maíz	68

3.2. <i>B. thuringiensis</i> UM96 disminuye la infección causada por el hongo <i>B. cinerea</i> en la planta <i>M. truncatula</i>	70
RESUMEN DE RESULTADOS	73
CONCLUSIÓN	74
PERSPECTIVAS	75
BIBLIOGRAFÍA	76

INTRODUCCIÓN

1. La rizósfera

La rizósfera es un micro-ecosistema delimitado por el área de suelo que es influenciada por la raíz de las plantas. El término fue introducido originalmente por Lorenz & Hiltner en 1904 y se utilizó para definir la zona en donde son liberados los exudados de la raíz y existe proliferación de microorganismos (Hirsch y Mauchline 2012).

En la rizósfera existe una alta diversidad de microorganismos, y se ha calculado que puede llegar a ser el doble de la que se encuentra en el suelo no rizosférico. Esto se debe a la constante liberación de exudados por la raíz de la planta que pueden ser una constante fuente de carbono útil para el crecimiento de microorganismos heterotróficos (Grayston et al. 1998).

2. Interacciones planta-microorganismo

En la rizósfera se sostienen interacciones microorganismo-planta, en las cuales las diversas especies de microorganismos puede tener diferentes efectos en la planta que pueden ser tanto perjudiciales, neutras y benéficas (Whipps 2001). Las interacciones benéficas se dan cuando los microorganismos logran beneficiar a la planta, ya sea mejorando su desarrollo, crecimiento y salud en general. A los microorganismos, y en especial a las bacterias que pueden promover el crecimiento vegetal se conocen como PGPR (por sus siglas en ingles **P**lant **G**rowth-**P**romoting **R**hizobacteria). Dicho término fue originalmente propuesto hace

|

algunas décadas por Kloepper & Schroth (1981). También se conocen como microorganismos PGP (por sus siglas en inglés de **Plant-Growth Promoting**), ya que no necesariamente pueden provenir de la rizósfera.

El estudio de las interacciones benéficas, así como el aislamiento y caracterización de los microorganismos PGP, denota su interés, al ser utilizados dentro de la agricultura para eliminar o reducir el uso de fertilizantes y plaguicidas químicos (Lucy et al. 2004). Esto adquiere mayor importancia debido a la aplicación desmedida de estos fertilizantes químicos, que causan la eutrofización del agua y por tanto su contaminación; aumentan la degradación del suelo y la pérdida de biodiversidad, además que su producción libera gases de efecto invernadero (Mulvaney et al. 2009). Igualmente los plaguicidas son muy contaminantes, tanto en su producción como en su aplicación, generando contaminación principalmente en suelos y mantos freáticos, lo que afecta a la salud humana (Akhtar et al. 2009).

De tal manera que el desarrollo de biofertilizantes y biocontroladores, basados en bacterias PGP, son una alternativa para un desarrollo sustentable de la agricultura (Bhattacharyya & Jha 2012). La aplicación directa del compuesto responsable de la promoción del crecimiento o bien con la inoculación del microorganismo, puede reducir los daños al ambiente y a la salud humana, y además mantener altos rendimientos en los campos de cultivo (Laslo et al. 2012). Dentro de los microorganismos PGP resaltan las bacterias, de las cuales se encuentra una mayor cantidad de células en el suelo, con un número que va de 10^8 a 10^9 células

|

por gramo de suelo (Bonkowski et al. 2000). Diversos reportes muestran que bacterias aisladas de la rizósfera (rizobacterias) han sido utilizadas no solo en la agricultura si no también en ámbitos forestales y de restauración del ambiente (Bhattacharyya & Jha 2012). Dentro de los géneros más destacados se encuentra *Pseudomonas* y *Bacillus* (Santoyo et al. 2012), aunque también se han reportado géneros como *Arthrobacter*, *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Burkholderia*, *Caulobacter*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Valazquez- Becerra et al. 2012; Glick 2012; Laslo et al. 2012)

3. Promoción de crecimiento vegetal por bacterias

Las bacterias tienen diversos mecanismos por los cuales logran promover el crecimiento de las plantas. El estudio de estos mecanismos ha tenido diversas aportaciones, pues ha permitido conocer algunos de los compuestos responsables de la promoción del crecimiento vegetal, así como los genes que participan en dicha actividad. Esto ha tenido su aplicación directa en el campo, ya sea al aplicar de manera directa el compuesto con actividad, o bien en la construcción de plantas transgénicas, así como para mejorar la actividad de las bacterias PGP. Los mecanismos por los que se llevan a cabo las interacciones benéficas, se les divide en mecanismos directos y mecanismo indirectos (Fig. 1).

3.1. Mecanismos directos

Uno de los mecanismos directos de promoción vegetal por parte de los

|

microorganismos es que facilitan la adquisición de nutrientes del suelo (Bonkowski et al. 2000). Las bacterias tienen varios mecanismos que permiten la solubilización de nutrientes, por ejemplo, la liberación de iones que facilitan la adquisición de elementos esenciales como el hierro, que es necesario para que las plantas puedan llevar a cabo la fotosíntesis (Orozco-Mosqueda et al. 2013a). La liberación de iones también facilita la adquisición de fósforo, elemento indispensable para el metabolismo catalítico (Hameeda et al. 2008). Además, las bacterias también sintetizan proteínas y péptidos que ayudan a la adquisición de nutrientes como los sideróforos en el caso del hierro (Santoyo et al. 2010), y las fosfatasa ácidas y fitasas en el caso del fosfato (Hameeda et al. 2008). Otro aspecto muy importante dentro de los mecanismos directos de las bacterias PGP es la fijación de nitrógeno atmosférico en amonio, forma en la que puede ser tomado por las plantas, algunas de las bacterias que destacan como fijadoras de nitrógeno son las de los géneros *Azospirillum*, *Mesorhizobium* y *Rhizobium* (Glick 2012).

Dentro de los mecanismos directos también se coloca la capacidad de algunas bacterias de sintetizar fitohormonas, que estimulan el crecimiento y desarrollo de la planta como el ácido indol acético, citocininas, giberelinas y etileno, dentro de los géneros bacterianos que más destacan en este ámbito son *Pseudomonas* y *Bacillus* (Joo et al. 2005; Barazani & Friedman 1999; Choi et al. 2011).

Otro mecanismo directo de gran interés, es la síntesis por parte de algunas bacterias, de moléculas de comunicación, las cuales tienen la capacidad de regular el crecimiento y desarrollo de una planta. Concretamente, moléculas como

|

las N-acil-L-homoserina lactonas (AHL) pertenecientes al sistema de comunicación de quorum sensing, propio de las bacterias Gram negativas. En especial, el género *Pseudomonas*, y la aplicación directa de AHL en las plantas de *Arabidopsis thaliana* logra cambiar la arquitectura de la raíz y promover el crecimiento vegetal (Ortíz-Castro et al. 2008). Existen otro tipo de moléculas de comunicación, los compuestos volátiles orgánicos (VOCs, por sus siglas en ingles **Volatile Organic Compounds**) que también se han reportado como compuestos capaces de modular el desarrollo de las plantas, y lograr así la promoción del crecimiento en *A. thaliana* (Ryu et al. 2003; Gutiérrez-Luna et al. 2010) y en plantas de *Medicago sativa* (Velázquez-Becerra et al. 2011).

3.2. Mecanismos indirectos

Por otro lado los mecanismos indirectos se realizan cuando el microorganismo defiende a la planta de un fitopatógeno, por lo que de manera indirecta mejora la salud de la planta. Para ello, los microorganismos, y particularmente las bacterias, sintetizan de una gran variedad de metabolitos y proteínas con efecto antimicrobiano. Por ejemplo las enzimas líticas, (de las cuales se hablará posteriormente de forma más profunda) como son las glucanasas, celulasas, quitinasas, proteasas y lipasas con actividad en contra de fitopatógenos (Glick 2012). Así, las celulasas y glucanasas han mostrado tener actividad en contra de Oomycetes como *Phytophthora parasitica* (Picard et al. 2000), mientras que, las quitinasas son ampliamente reportadas en contra de hongos fitopatógenos (de

|

Boer 2001), y la actividad sinérgica de quitinasas y otras enzimas líticas como glucanasas también ha sido reportada (Leveau & Preston 2008). Los géneros bacterianos que destacan por la actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos, debido a enzimas líticas, son *Serratia*, *Bacillus*, *Actinomyces* y *Streptomyces* (Gomes et al. 2000; Swiontek et al. 2013).

Además, existe una amplia cantidad de antibióticos con actividad antifúngica y/o antimicrobiana con una gran diversidad de composición química como el 2-4 diacetilfloroglucinol, además de los VOCs como el cianuro de hidrógeno y la dimetilhexadecilamina (Velázquez-Becerra et al. 2013; Haas et al. 2005) o bien de tipo peptídico y lipopeptídico como las iturinas, sintetizados ampliamente en los géneros de *Pseudomonas* y *Bacillus*, respectivamente (Haas et al 2005; Santoyo et al. 2012). Otro mecanismo indirecto es la Inducción del Sistema de Resistencia (ISR) el cual se lleva a cabo por microorganismos capaces de liberar diferentes compuestos llamados elicitores que provocan una respuesta inmune de amplio espectro en la planta. Algunos compuestos elicitores que pueden disparar la ISR son el ácido salicílico, flagelos, lipopolisacáridos, sideróforos y la combinación de piocianina y pioquelina (Audenaert et al. 2002). Además, también se ha reportados como elicitores el compuesto volátil 2,3-butanediol (Ryu et al. 2004).

Dentro de los mecanismos indirectos se incluye, la capacidad de algunos microorganismos de proteger a las plantas del estrés abiótico, como es la desecación y la salinidad del suelo. La síntesis de etileno aumenta en las plantas que se encuentran en condiciones de estrés, esto causa una disminución del

|

crecimiento de la raíz y el crecimiento de brotes. Algunas bacterias pueden sintetizar una enzima llamada ACC deaminasa, que puede degradar el ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato), precursor directo de la síntesis de etileno, lo que disminuye su síntesis y permite un mayor desarrollo de las plantas que se encuentran en condiciones de estrés. Además, bacterias que sintetizan citocininas también se han relacionado con ayudar a la planta a resistir el estrés ambiental por su antagonismo con el ácido abscísico (ABA) (Yang et al. 2009).

4. Producción de enzimas líticas en bacterias rizosféricas

Como se mencionó anteriormente las enzimas líticas de los microorganismos funcionan como mecanismos para inhibir el crecimiento de hongos y Oomycetes fitopatógenos. Sobresalen enzimas como glucanasas, celulasas y quitinasas, en las cuales nos enfocaremos en las siguientes secciones.

4.1. Glucanasas

Las β -glucanasas son enzimas que catalizan la degradación de glucanos, mediante la hidrólisis del enlace β -1,3 en la cadena de glucano. La estructura y tamaño de las β -glucanasas es muy diverso, y de manera general se distinguen por su actividad de endo- β -glucanasas o exo- β -glucanasas. Las endo- β -glucanasas hidrolizan las cadenas de β -glucanos en el interior de la misma, de manera azarosa. Mientras que las exo- β -glucanasas necesitan un extremo libre de

|

la cadena de glucanos, para así generar monómeros de glucosa (Pitson et al. 1993). Esta distinción de actividad enzimática, que refiere al sitio en donde se realiza la hidrólisis de los enlaces β en una cadena de carbohidratos, se realiza también en las quitinasas y celulasas, siendo éstas divididas en endo-quitinasas y exo-quitinasas, endo-celulasas y exo-celulasas (Davies & Henrissat 1995).

De manera más particular las β -glucanasas de las bacterias difieren a las β -glucanasas de las plantas, tanto en el nivel de su secuencia de aminoácidos, como a nivel estructural. Las β -glucanasas de las bacterias pertenecen a la familia 16 de las glicosil hidrolasas, mientras que en las plantas las β -glucanasas se ubican en la familia 17. Todo ello sugiere un origen distinto de estas proteínas en estos organismos, aunque mantienen la misma función catalítica (Gaiser et al. 2006). La estructura de las β -glucanasas de las bacterias consiste en un plegamiento tipo beta-sandwiches, mientras que en las plantas las β -glucanasas presentan un plegamiento en barril TIM (Gaiser et al. 2006). La síntesis de las β -glucanasas en bacterias se relaciona como un mecanismo para la obtención de nutrientes, al desintegrar principalmente la pared celular de los hongos. Recordemos que la pared celular de los hongos está formada en gran medida de β -1,3 y β -1,6 glucanos (Cheng et al. 2009).

La actividad antagónica de las β -glucanasas de bacterias ha sido reportada en el género de *Pseudomonas* sp. En la especie *P. fluorescens* con acción antagónica hacia el hongo *Rhizoctonia solani* (Nagarajkumar et al. 2004) y en *P. stutzeri* contra el hongo *Fusarium solani* (Lim et al. 1991). En caso del género *Bacillus* se

|

encontró actividad de β -1,3 glucanasa en la especie *B. amyloliquefaciens*, la cual presentó antagonismo hacia el hongo *Colletotrichum lagenarium* (Kim & Chung 2004). Recientemente, Abraham et al. (2013) vuelven a relacionar las β -glucanasas de *B. amyloliquefaciens*, con su actividad antagónica, en contra del Oomycete *Phytophthora meadii*. Además, la actividad antagónica de β -glucanasas en contra de *R. solani* también ha sido reportada en cepas del género *Paenibacillum* (Cheng et al. 2009).

La actividad antifúngica de las β -glucanasas actúan de forma sinérgica con quitinasas, en contra de hongos fitopatógenos, y en contra de Oomycetes, pero aquí de manera sinérgica con celulasas. Por ejemplo, la adición de quitinasas y β -glucanasas de *Trichoderma harzianum* causa una mayor disminución en el crecimiento en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea*, en comparación a la disminución en el crecimiento que causa la aplicación de cada enzima de manera individual (Haran et al. 1996).

En especial, algunas β -glucanasas del género de *Bacillus* se han clonado y caracterizado, en el caso específico de especies como *B. halodurans*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. licheniformis* (Planas 2000). Sin embargo, hasta ahora no se ha determinado la actividad antifúngica de las β -glucanasas de estas especies, por lo que es de gran interés profundizar más en la capacidad antagónica de las glucanasas en el género *Bacillus*, y en especial de la especie *B. thuringiensis*.

|

4.2. Celulasas

Las celulasas son glicosil hidrolasas que rompen el enlace glucosídico β -1,4. Las celulasas de bacterias se ubican en la familia 16 de las glicosil hidrolasas, por lo que se encuentran relacionadas con las β -glucanasas, su plegamiento también es en forma de beta sandwiches. Así que, de manera similar a las β -glucanasas, las celulasas no se encuentran relacionadas con las celulasas de plantas, por lo que, se plantea también un fenómeno de convergencia evolutiva al tener las celulasas de bacterias y plantas un origen distinto (Gaiser et al. 2006).

El interés en las celulasas como mecanismo de inhibición de fitopatógenos, tiene particular interés en la Clase Oomycetes, ya que, a diferencia de los hongos, los Oomycetes conforman su pared celular principalmente de celulosa. Las celulasas de diferentes microorganismos han mostrado tener actividad en contra de varios Oomycetes fitopatógenos (Haran et al. 1996; Picard et al. 2000). En cuanto a las bacterias, en las que se ha relacionado la actividad de celulasas en contra de hongos fitopatógenos se encuentran *Bacillus circulans* y *Paenibacillus polymyxa* en contra de los Oomycetes fitopatógenos *Aphanomyces cochlioides* y *Pythium ultimum* (Nielsen & Sorensen 1997). La actividad antagónica hacia *Phytophthora capsici* y *P. ultimum* de las bacterias *Bacillus gibsonii*, *Bacillus stratosphericus*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Bacillus aerius* y *Pseudomonas koreensis* también ha sido relacionada con la actividad de celulosas (Bibi et al. 2012). Además, la actividad sinérgica de β -glucanasas y celulasas en contra de Oomycetes ha sido propuesta en las

|

especies *Martellella mediterranea* y *Stenotrophomonas rhizophila* (Bibi et al. 2012).

Otras especies en donde la actividad de celulasas ha sido reportada, pero no relacionada con actividad hacia fitopatógenos son, *Micrococcus endophyticus*, *Ruminococcus flavofaciens* y *Termobifida fusca* (Coughlan 1991). En especial, en el género *Bacillus* la actividad de celulasas se ha reportado en *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus macerans*, *Bacillus circulans*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus licheniformis* y *Bacillus brevis* (Planas 2000; Lima et al. 2005).

4.3. Quitinasas

Las quitinasas son glicosil hidrolasas que rompen el enlace β -1,4 en las cadenas de quitina, generando moléculas de N-acetilglucosamina. En las bacterias las quitinasas se ubican dentro de familia 18 de las glicosil hidrolasas, de manera similar a lo que ocurre en glucanasas y celulasas se propone que tienen un origen distinto a las quitinasas de las plantas, que pertenecen a la familia 19, y también difieren estructuralmente a las quitinasas de las bacterias (Prasanna et al. 2013). Dentro de las diferentes enzimas líticas, las quitinasas han sido objeto de mayor atención ya que existe un mayor número de reportes de su actividad antagónica contra hongos fitopatógenos y mayor interés sobre la aplicación de estos organismos quitinolíticos en los campos de cultivo (Swiontek et al. 2013).

Dentro de la actividad quitinolítica de las bacterias sobresalen los Actinomycetes, donde el género *Streptomyces* ha sido ampliamente estudiado. En particular,

|

Streptomyces halstedii, *Streptomyces griseus* y *Streptomyces cavourensis* sintetizan quitinasas con actividad antifúngica hacia varios hongos fitopatógenos (Joo 2005; Lee et al. 2012). En el caso de *S. cavourensis* se observó actividad de β -glucanasas que actúa conjuntamente con las quitinasas inhibiendo el crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Lee et al. 2012).

La actividad de quitinasas se ha reportado también en especies bacterianas como *P. fluorescens*, que han sido asociadas a la actividad antifúngica contra el hongo *R. solani* (Nielsen et al. 1998). Por otro lado, las quitinasas de la especie *Brevibacillus laterosporus* mostraron actividad inhibitoria del desarrollo de *Fusarium equiseti* (Prasanna et al. 2013).

El género *Bacillus* también presenta actividad de quitinasa en contra de hongos fitopatógenos. Por ejemplo, la quitinasa de *B. pumilus* ha mostrado actividad antifúngica contra los hongos *Fusarium graminearum*, *Rhizoctonia solani*, *Magnaporthe grisea*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Trichoderma reesei* y *Bipolaris* sp. (Ghasemi et al. 2010). Recientemente, se purificó la quitinasa de *B. cereus*, la cual mostró tener actividad hacia *B. cinerea* (Hammami et al. 2013).

Microorganismos en donde se ha reportado actividad de quitinasas pero no ha sido relacionada con actividad antifúngica son: *Aeromonas*, *Enterobacter*, *Chromobacterium*, *B. subtilis*, *B. brevis*, *B. licheniformis* y *B. stratosphericus* (Nielsen & Sorensen 1997; Swiontek et al. 2013).

5. El género *Bacillus* como promotor del crecimiento vegetal

El género *Bacillus* está formado por bacterias aerobias formadoras de endosporas, y es un habitante común y abundante en el suelo (Nielsen & Sorensen 1997). Su capacidad de esporulación ha favorecido que se les utilice en la elaboración de biofertilizantes y bioplaguicidas, ya que las endosporas permiten la sobrevivencia del inóculo en condiciones de desecación, calor o escasez de nutrientes (Kloepper et al. 2004).

Diferentes especies de *Bacillus* han sido de utilidad en campos de cultivo y han logrado mejorar la producción de manera directa o indirecta (Kumar et al. 2011). Dentro de los mecanismos directos ya reportados en el género, se encuentra la síntesis de fitohormonas y la solubilización de nutrientes, debido a la síntesis de enzimas como fosfatasas ácidas y sideróforos (Ryu et al. 2005; Singh & Satyanarayana 2011). Dentro de los mecanismos indirectos sobresale la síntesis de antibióticos peptídicos y la inducción del sistema de resistencia (Kloepper et al. 2004). Dentro de las especies que tienen tanto mecanismos directos como mecanismos indirectos de promoción, se puede mencionar a *B. subtilis*, *B. amyloliquefaciens*, *B. pumilus* y *B. cereus* (Bhattacharyya & Jha 2012; Kumar et al. 2011). Por otro lado, *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* sobresalen por su capacidad de ser patógenas de insectos, aunque también otras especies como *B. popilliae* presentan actividad insecticida (Federici 2005). En especial *B. thuringiensis* es muy utilizada como biocontroladora de insectos en campos de cultivo.

Por todo esto, el estudio en el género *Bacillus* en el ámbito de sus capacidades y

|

aplicación como bacteria PGP sigue siendo de gran interés, desde encontrar cepas de *Bacillus* que contengan varios mecanismos de promoción (Santoyo et al. 2012), así como realizar estudios que permitan un mejor conocimiento de la ecología de estas especies. Además, es de suma importancia identificar en estas bacterias, cuales son los genes claves en las vías de síntesis de los compuestos responsables de la promoción del crecimiento vegetal. Por dar un ejemplo el gen *ipdC* que codifica la indol-3- piruvato decarboxilasa enzima clave en la síntesis de ácido indol acético

6. Generalidades de la especie *Bacillus thuringiensis*

B. thuringiensis es una bacteria Gram-positiva, se aisló y caracterizó por primera vez en Japón (1901) y desde entonces ha sido aislada de múltiples ambientes, como el suelo, suelo rizosférico, la superficie de las hojas de las plantas, agua y en larvas de insectos. El tamaño de su genoma varia de 2.4 a 5.7 Mb (Millones de pares de bases) (Carlson et al. 1994).

El ciclo de vida del género *Bacillus*, se divide en una fase vegetativa y una fase de esporulación. La esporulación es un proceso de diferenciación celular que le permite a *Bacillus* resistir el estrés ambiental.

Dentro del género, la especie *B. thuringiensis* pertenece al grupo de *B. cereus* sensu lato (en un sentido amplio) que está compuesto por *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. weihenstephanensis* y *B. cereus*

|

seso stricto (en sentido estricto) (Jensen et al. 2003). Estas especies están estrechamente relacionadas entre ellas, inclusive el análisis de las secuencias de genes como ADNr 16S y 23S, sugiere que son una misma especie (Daffonchio et al. 2000). Sin embargo todas estas especies sostienen diferencias ecológicas y fisiológicas (Jensen et al. 2003). Por ejemplo, el nicho de *B. anthracis* corresponde al de patógeno, causando la enfermedad de ántrax, mientras que *B. cereus* es una patógena oportunista de humanos, causando problemas gastrointestinales. Por otro lado, *B. thuringiensis* es patógena de insectos (Drobniewski 1993). Esta diferencia en los nichos de estas especies genera especial atención a la distinción entre ellas, ya que existen claros intereses clínicos y agronómicos muy importantes, tal es el caso, que muchos autores se han dedicado a generar pruebas prácticas y rápidas que permitan distinguir las especies de este grupo tan similar (Hansen et al. 2001; Manzano 2003).

7. *B. thuringiensis* y la importancia de los genes cry

Durante el proceso de esporulación, *B. thuringiensis* sintetiza el cuerpo paraesporal, una estructura que le confiere la capacidad de ser patógena de larvas de insectos. El cuerpo paraesporal presenta varias morfologías, tales como formas esféricas, en forma de “capucha” e inclusive se han encontrado morfologías extrañas de forma esférica pero con pequeños apéndices en forma de punta (Rampersad et al. 2002). Sin embargo, la morfología más común es la de forma de “cristal” o “diamante”. De hecho las proteínas Cry que conforman el cuerpo

|

paraesporal deben su nombre a esta morfología en forma de cristal. Las proteínas Cry son ingeridas por el insecto y son parcialmente degradadas por las proteasas propias del insecto, generando monómeros de proteínas Cry. Los monómeros son la forma activa de las proteínas Cry, de esta manera llegan al intestino del insecto y dañan las células epiteliales del mismo (Vachon et al. 2012; Bravo et al. 2011). Con esto el insecto pierde la capacidad de absorber sus alimentos y muere. *B. thuringiensis* es capaz de ser patógena de varios insectos, que incluyen los Órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera, inclusive se han encontrado cepas con la capacidad de ser patógenas de nemátodos (Bravo et al. 2011).

La expresión de los genes *cry* se encuentra regulada por los factores de transcripción sigma e y sigma k, factores que son activados durante el proceso de esporulación de *B. thuringiensis* (Baum & Malvar 1995). Los genes *cry* son muy diversos y se han dividido en 22 grupos por la similitud de la cadena de aminoácidos. Para darnos una idea de la diversidad de estos genes, tan sólo el primer grupo, éste es los genes *cry1*, suman hasta ahora 258 genes clonados y nombrados (Shu et al. 2013). No obstante la secuencia de aminoácidos de todos estos genes conservan 3 dominios. La función específica de cada dominio no ha sido debidamente comprobada y actualmente existe controversia sobre el mecanismo de las proteínas Cry para llevar a cabo la muerte del insecto, en donde existen dos enfoques contrarios: el primero enfoca la formación de un poro en las células epiteliales del intestino del insecto, y el segundo apoya la injerencia de las proteínas Cry en vías catabólicas esenciales en las células del insecto (Vachon et

|

al. 2012). Sin embargo el dominio 1 está relacionado con la formación del poro en la membrana del insecto, o canal iónico, mientras que el dominio 2 y 3 están relacionados con el reconocimiento de receptores transmembranales de las células epiteliales del intestino del insecto (Bravo et al. 2011).

Ahora bien, la importancia agronómica de *B. thuringiensis*, mencionada anteriormente, proviene principalmente de su capacidad de ser patógena del Orden Lepidoptera, que contiene especies de insectos plaga de cultivos agrícolas de plantas de interés agrícola, esta capacidad de *B. thuringiensis* de ser patógena de insectos ha sido de mucha utilidad para el ser humano, y se debe principalmente a los genes del grupo *cry1*, aunque también genes pertenecientes a los grupos *cry2* y *cry7*, han sido frecuentemente relacionados con la patogenicidad al Orden Lepidoptera (de Maagd et al. 2001).

B. thuringiensis ha sido aplicada en campos de cultivo como biocontroladora de insectos plagas durante décadas y ya se han realizado más de 100 diferentes bioinsecticidas con cepas de esta especie (Heckel et al. 2007). Además el uso de *B. thuringiensis* en contra de insectos patógenos va más allá de su aplicación directa, ya que desde 1996, los genes *cry*, sobretodo los pertenecientes a la familia *cry1A*, han sido utilizados para la elaboración de transgénicos en plantas de maíz, algodón, soya y arroz (Crickmore 2006). Además se propone aprovechar la capacidad de *B. thuringiensis* de ser patógena del Orden de Diptera, con un uso clínico, de manera indirecta, esto al aplicarla en sitios de proliferación de mosquitos, ya que estos son importantes vectores de enfermedades.

|

8. Características generales del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*

B. cinerea es un Ascomiceto cosmopolita patógeno de plantas que ataca a más de 200 especies, es comúnmente conocido como el moho gris, y ataca principalmente plantas dicotiledóneas, muchas de ellas de importancia agrícola como fresa, uva, lechuga, brócoli, tomate, pepino, varias leguminosas como el frijol y la alfalfa, entre muchas otras (Dean et al. 2012).

B. cinerea es considerado un patógeno aéreo y ataca principalmente flores, frutos, hojas y brotes. Aunque también ha sido aislado de raíces tuberculosas, como la zanahoria, la papa, y el camote, no es considerado un patógeno del suelo (Droby & Lichter 2004)

B. cinerea produce varios conidióforos ramificados con varias conidas elipsoidales, incoloras. A menudo forma esclerocios, esta estructura genera resistencia a la desecación, rayos UV y el ataque de otros microorganismos, El esclerocio contiene en la corteza superior pigmentos melánicos, y las hifas están rodeadas por una matriz continua de β -glucanos, y las reservas de nutrientes intracelulares son proteínas, glucógeno, polifosfato y lípidos (Beever & Weeds 2004).

ANTECEDENTES

1. Especies de *B. thuringiensis* como antagonistas de hongos fitopatógenos

B. thuringiensis ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de controlar insectos plaga. Uno de los mecanismos más estudiados es la diversidad y producción de proteínas Cry, las cuales están directamente involucradas en su actividad entomopatógena. No obstante algunas otras áreas de investigación de *B. thuringiensis* han comenzado a develar interesantes características de esta especie. Por ejemplo en su capacidad de realizar el biocontrol de hongos y bacterias fitopatógenas. Esto la coloca como especie de interés, ya que puede llegar a ser utilizada para biocontrol a más de un tipo de fitopatógeno.

La capacidad de *B. thuringiensis* de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos ha sido atribuida a varios compuestos. Por ejemplo el antibiótico zwittermicina A cuya estructura se dilucidó como un aminopoliool linear (Stabb et al. 1994), que mostró actividad principalmente a Oomycetes como *Phytophthora medicaginis*, *Phytophthora megasperma*, *Phytophthora nicotianae*, *Pythium aphanidermatum* y *Pythium torulosum* (Nair et al. 2004; Shao et al. 2008; Silo-Suh et al. 1998), y algunos hongos fitopatógenos como son *Alternaria*, *Fusarium*, *Helminthosporium*, y *Ustilago* (Silo-Suh et al. 1994). Uno de los intereses que existen en la zwittermicina A, es que la síntesis de este antibiótico solo se ha encontrado en *B. thuringiensis* y en sus especies más relacionadas como *B. cereus* y *B. mycoides* (Zhou et al. 2008). Los genes involucrados en su síntesis también han sido estudiados, y debido a que no existe un operón que codifique la síntesis del

|

antibiótico, sino más bien un grupo de genes localizados en diferentes loci, el estudio de este antibiótico se vuelve complicado, ya que se cree que existen 5 compuestos precursores para llegar a la síntesis de la zwittermicina A (Emmert et al. 2004).

Como se mencionó anteriormente, el género *Bacillus* sobresale por la síntesis de antibióticos peptídicos y lipopeptídicos, por lo que se han reportado algunos lipopéptidos con actividad antagónica hacia hongos fitopatógenos. Un nuevo lipopéptido denominado Kurstakins se determinó por espectrometría de masas en *B. thuringiensis* con actividad hacia el hongo *Stachybotrys charatum* (Hathout et al. 2002). Además, en *B. thuringiensis* se purificó un lipopéptido similar a la fengicina cuya estructura se determinó por HPLC y espectrometría de masas MALDI-TOF. El lipopéptido mostró actividad inhibitoria hacia los hongos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea*, *Sclerotium cepivorum* y *Colletotrichum coccodes*. De manera singular, este lipopéptido también mostró actividad en contra de la larva del lepidóptero *Pieris rapae crucivora*, una plaga de especies del género *Brassicaca* como la col, la coliflor y el brócoli. Lo que permitió sugerir a *B. thuringiensis* como una posible biocontroladora de más de un tipo de plaga (Kim et al. 2004).

Además *B. thuringiensis*, aunque en menor medida, también ha sido reportada como una bacteria capaz de inducir el sistema de resistencia de las plantas. La inoculación de *B. thuringiensis* en las raíces de plantas de tomate infectadas con *Ralstonia solanacearum*, aumentó la actividad de las enzimas del tomate

|

relacionadas con la patogenicidad (PR): quitinasas y β -glucanasas y disminuyó la infección causada por el hongo (Takahashi et al. 2013). Hyakumachi et al. (2013) inocularon a *B. thuringiensis* en plantas de tabaco infectadas con *R. solanacearum*. Reportaron el aumento en la expresión de genes relacionados con la respuesta de defensa en la vía del ácido salicílico (SA) mientras que los genes relacionados con la vía del ácido jasmónico (JA) no fueron inducidos.

2. *B. thuringiensis* presenta actividades líticas

El estudio de las enzimas líticas y su papel en la inhibición de hongos fitopatógenos en la especie *B. thuringiensis* ha sido poco estudiado.

Con respecto a la síntesis de β -glucanasas existe un reporte en donde se analizó la presencia de actividad 1,3- β -glucanasas en 27 cepas de *B. thuringiensis*. El 74% de las cepas analizadas (20 cepas) pudieron degradar glucano. Esto sugirió que las β -glucanasas podrían estar ampliamente distribuidas en las cepas de la especie *B. thuringiensis* (Martin et al. 1980). De manera más reciente se reportó la amplificación del gen putativo que codifica para β -glucanasas en 3 cepas de *B. thuringiensis* (Raddadi et al. 2009). En cuanto a las bases de datos en la anotación de funciones putativas de genes así como en los reportes de secuenciación completa de cepas de *B. thuringiensis* existen genes que han sido anotados como posibles β -glucanasas (Guan et al. 2012).

Con respecto a las celulasas, se reportó actividad en algunas cepas de *B. thuringiensis* en rangos que van de 0.01 a 0.07 Unidades (U) (Lin et al. 2012;

|

Tenorio-Sánchez 2010). Estas unidades de actividad, en las cepas de *B. thuringiensis*, son bajas comparadas con otras especies bacterias del género, como *B. pumilus*, que presentó actividad de celulasas en un promedio de 8.25 U/mg de proteína (Lima et al. 2005). En las bases de datos y reportes de secuenciación completa de cepas de *B. thuringiensis*, existen genes que han sido anotados como posibles celulasas (He et al. 2010).

Finalmente, no existen reportes que relacionen la actividad de β -glucanasas y de celulasas con la capacidad antifúngica de *B. thuringiensis*. Debido a todo esto, tanto la actividad de β -glucanasas como la actividad de celulasas en *B. thuringiensis*, es un ámbito que debe ser estudiado más profundamente.

Por otro lado la actividad de quitinasas de *B. thuringiensis* ha sido más estudiada y existen varios reportes de la presencia de la actividad en estas cepas. Driss et al. (2005) revisaron un total de 256 cepas de *B. thuringiensis* de las cuales el 87% de ellas presentó actividad. De manera contrastante Rosas-García et al. (2013) analizaron 85 cepas donde sólo el 9.41% de ellas presentó actividad.

De manera general, las quitinasas de *B. thuringiensis* presentan actividad óptima a pH 5 a 6.5, aunque mantienen actividad en pH de 4 a 9. La actividad optima se da a temperaturas que van entre los 50 y 55°C, y existe perdida en la actividad a partir de los 60°C (Arora et al. 2003; Rosas-García et al. 2013). Además, las secuencias de quitinasas de *B. thuringiensis* son conservadas mostrando porcentajes de identidad que van entre 89-99%, esto incluye tanto genes que codifican endoquitinasas como exoquitinasas en *B. thuringiensis* (Lin & Xiong

|

2004).

Sin embargo, en cuanto a la relación que existe de la actividad de quitinasa y la capacidad antagónica de la especie *B. thuringiensis* hacia hongos fitopatógenos existen pocos reportes. Hasta donde sabemos, solo hay 3 trabajos en donde se relacionó la actividad de quitinasas de *B. thuringiensis* con su capacidad antifúngica. Sin embargo, es de recalcar que no hay trabajos sobre el biocontrol, donde se involucre a la planta en tales experimentos.

Reyes-Ramírez et al. (2006), reportaron la actividad antifúngica de la quitinasa purificada de *B. thuringiensis* contra varias especies de hongos fitopatógenos: *Sclerotium rolfii*, *Helminthosporium* sp., *Nigrospora* sp., *Curvularia* sp., *Aspergillus flavus*, *Aspergillus candidus*, *Aspergillus terreus*, *Absidia* sp., *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Rhizopus* sp. La quitinasa inhibió el crecimiento de prácticamente todos los hongos, a excepción del hongo *A. niger*. Además se observó que la aplicación de la quitinasa en semillas de soya infectadas con el hongo *S. rolfii* aumentó los porcentajes de germinación en las semillas y a partir de la concentración de 0.6 U/mg de proteína, los porcentajes de germinación son estadísticamente iguales a las semillas control, que no fueron infectadas con el hongo (Fig. 2).

En un trabajo similar de Morales de la Vega et al. (2006), la aplicación de quitinasa de *B. thuringiensis* mejoró la germinación de semillas de soya infectadas con los hongos *Pestalotia* sp., *Fusarium* sp., *Macrophomina* sp. y *Helminthosporium* sp. En todos los casos los porcentajes de germinación son significativamente

|
mayores, con respecto a las semillas infectadas sin ningún tratamiento.

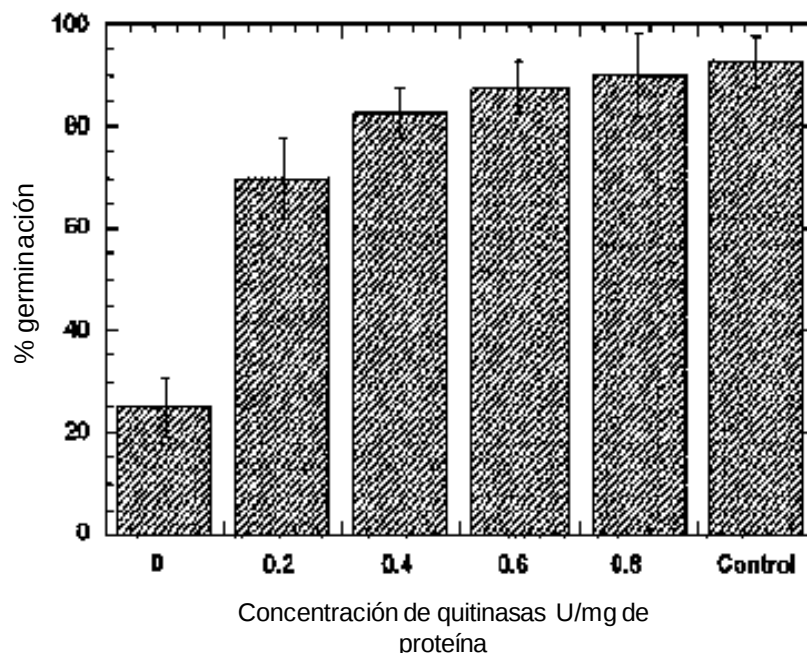


Figura 2. Efecto de la quitinasa de *B. thuringiensis* sobre la germinación de semillas de soya infectadas por el hongo *Sclerotium rolfsii*. La quitinasa de *B. thuringiensis* se aplicó en diferentes concentraciones (0.2 a 0.8 U/mg de proteína) el tratamiento control consistió en semillas de soya sin infección del hongo. $\pm$ DE. Tomado de Reyes-Ramírez et al. 2004.

En el trabajo de Gomaa (2012) se comparó la actividad antifúngica de quitinasa de *B. thuringiensis* y la quitinasa de *B. licheniformis*. Estas quitinasas inhibieron el crecimiento de manera significativa, de los hongos *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. terreus*, *Fusarium* sp., *F. oxysporum*, *Ralstonia solanacearum*, *Rhizopus* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. viride* y *Verticillium* sp. (Fig. 3). Además, la quitinasa de *B. thuringiensis*, en algunos casos disminuyó en mayor medida el crecimiento de

los hongos en comparación a la quitinasas de *B. licheniformis* (Fig. 3). Esto fue más claro en los hongos *F. oxysporum*, *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Verticillium* sp. (Fig. 3). De tal manera que, las quitinasas de *B. thuringiensis* en comparación con las de *B. licheniformis* podrían tener mayor aplicación y posibilidad para ser utilizadas como biocontroladoras.

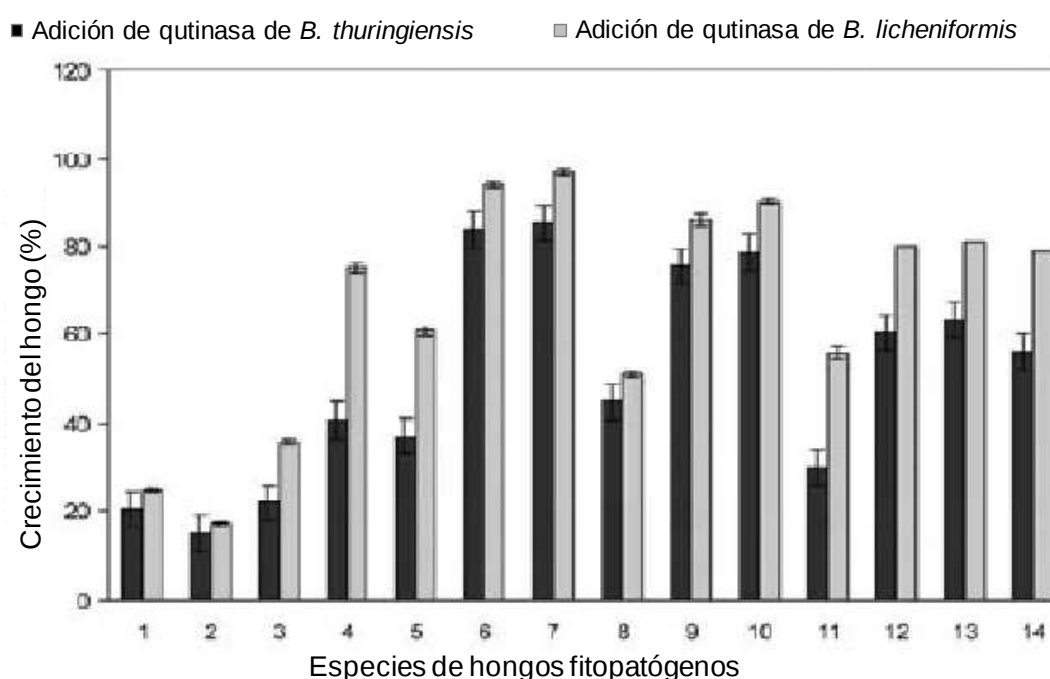


Figura 3. Efecto de las quitinasas de *B. thuringiensis* y *B. licheniformis* en el crecimiento de hongos fitopatógenos. 1, *Aspergillus flavus*; 2, *Aspergillus niger*; 3, *Aspergillus terreus*; 4, *Fusarium oxysporum*; 5, *Fusarium* sp.; 6, *Penicillium chrysogenum*; 7, *Pythium* sp.; 8, *Ralstonia solanacearum*; 9, *Rhizoctonia solani*; 10, *Rhizoctonia* sp.; 11, *Rhizopus* sp.; 12, *Trichoderma harzianum*; 13, *Trichoderma viride*; 14, *Verticillium* sp. $\pm$ DE. Tomado de Gomaa 2012.

3. Aislamiento de la cepa antifúngica *Bacillus* sp. UM96

En trabajos propios (Martínez-Absalón et al. 2012) se buscaron cepas con

|

actividades antifúngicas en rizósfera de plantas de sorgo cultivadas en campos del municipio de Tarímbaro que pertenecen a la Posta Zootécnica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMNSH). El trabajo se centró en un aislado denominado como cepa UM96, la cual mostró actividad antifúngica en contra de los hongos fitopatógenos *F. oxysporum*, *Diaporthe phaseolorum*, *Colletotrichum acutatum* y *Rhizoctonia solani*. Dentro de estas cuatro especies de hongos fitopatógenos, la cepa UM96 disminuyó el crecimiento de los hongos de manera diferencial. Por ejemplo, el hongo *C. acutatum* presentó una mayor disminución en su crecimiento al ser inoculada con la cepa UM96, y por otro lado, el hongo menos inhibido fue *F. oxysporum* (Martínez-Absalón et al. 2012).

La cepa UM96 se clasificó dentro del género *Bacillus* con la secuencia parcial (790 pb) del gen de ADNr 16S. El porcentaje de identidad del gen parcial de ADNr 16S fue de 91% respecto a la especie *B. amyloliquefaciens*. Este bajo porcentaje de identidad sugirió que, *Bacillus* sp. UM96 podría ser una especie nueva aún no descrita (Martínez-Absalón et al. 2012).

En trabajos posteriores *Bacillus* sp. UM96 también inhibió del hongo *B. cinerea* y se observó que la capacidad de inhibición de *Bacillus* sp. UM96 dependió del tiempo de inoculación del aislado con respecto a los hongos. *Bacillus* sp. UM96 presentó mayor inhibición al crecimiento de ambos hongos cuando se inoculó 24 horas antes que los hongos, en comparación a la inoculación simultanea de los hongos y de la cepa *Bacillus* sp. UM96. La capacidad de inhibición disminuyó cuando los hongos se inocularon con 24 horas de ventaja sobre la bacteria.

|

Además, *Bacillus* sp. UM96 se inoculó en un sistema *in vitro* en la planta *Medicago truncatula*, en donde no logro promover de manera significativa el crecimiento de las plantas (Rojas-Solís. 2012. Tesis de Licenciatura. UMSNH).

Debido a que *Bacillus* sp. UM96 inhibe el crecimiento de varias especies de hongos fitopatógenos, es de nuestro interés continuar con el análisis de los mecanismos de inhibición, así como analizar el potencial de la cepa UM96 para ser utilizada como biocontroladora de hongos (Martínez-Absalón et al. 2012).

|

JUSTIFICACIÓN

El uso de biofungicidas bacterianos es una alternativa para disminuir la aplicación de químicos en la agricultura. Estudios previos en nuestro grupo de trabajo muestran que la cepa *Bacillus* sp. UM96 posee la capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos. Sin embargo se desconocen los mecanismos por medio de los cuales ejerce esta inhibición. Adicionalmente es importante que las cepas que muestran capacidades para ser aplicadas en campos como biocontroladores sean evaluados

HIPÓTESIS

La cepa *Bacillus* sp. UM96 produce enzimas líticas involucradas en el biocontrol de hongos fitopatógenos.

|

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar las actividades líticas de la cepa *Bacillus* sp. UM96 y su capacidad de biocontrol de hongos fitopatógenos.

Objetivos específicos

1. Determinar la especie a la que pertenece la cepa *Bacillus* sp. UM96.
2. Detectar los genes *chi* en *Bacillus* sp. UM96 y evaluar la actividad de enzimas líticas (quitinasa, celulasa y glucanasa).
3. Comparar la actividad antifúngica del sobrenadante de *Bacillus* sp. UM96 con quitinasa pura.
4. Evaluar las capacidades de colonización de *Bacillus* sp. UM96 en la rizósfera de maíz (*Zea mays*).
5. Determinar las capacidades de *Bacillus* sp. UM96 en el biocontrol de *Botrytis cinerea* en plantas de *Medicago truncatula*.

|

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Caracterización molecular de *Bacillus* sp. UM96

1.2. Amplificación del gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96

El ADN genómico de UM96 se obtuvo con el Kit Wizard SV Genomic DNA Purification System de acuerdo al protocolo comercial.

El aislamiento del gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96 se realizó mediante PCR con los oligos universales Fd1 y Rd1 (Weisburg et al. 1991). Las características específicas de estos y todos los oligos utilizados en este trabajo se encuentran listados en la Tabla 1. Las condiciones del termociclador para la reacción del PCR en este caso fueron las siguientes: Desnaturalización inicial de 95 °C/3 min, 40 ciclos que consistieron de 95 °C/1 min, 53m°C/1 min y 72 °C/2 min, la temperatura final de extensión fue de 72n°C/10 min. El termociclador utilizado fue Techne TC-412. El tubo de reacción de PCR contenía: 15 µl de Master Mix (Taq ADN polimerasa, dATP, dGTP, dCTP, dTTP, MgCl₂) 1 µl de Fd1 20 nM y 1 µl de Rd1 20 nM, 1 µl de templado de ADN genómico y 6 µl de agua libre de nucleasas para un total de 24 µl.

El producto del PCR se observó por medio de un corrimiento electroforético en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TAE (Tris base, Ácido acético glacial y EDTA concentraciones). Las muestras de ADN se cargaron con 1 µl de GelRed™ colorante de fluorescencia por cada 5 µl de muestra de ADN y se corrieron con un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora. Las bandas se observaron en un transluminador Bio Rad de luz UV de onda corta.

|

El producto de PCR se purificó con el Kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System siguiendo el protocolo de la casa comercial.

1.3. Secuenciación de gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96

Para la secuenciación se diseñaron oligos de secuenciación internos, para lo cual se utilizó la herramienta de Web Primer de *Saccharomyces* Genome Database, se obtuvieron dos pares compuestos por los oligos delanteros: 601F 5'TGATGTGAAAGCCCACGG3' y 1201F 5'CATCATGCCCCTTATGAC3' y los reversos: 327R 5'ACACTGGGACTGAGACAC3' y 929R 5'AAAGGAATTGACGGGGGC3' (Tabla 1). Como secuencia de referencia se utilizó el gen de ADNr 16S de *B. thuringiensis* subsp. *chinensis* CT-43 con número de acceso CP001907.1. La secuenciación se realizó en el Cinvestav Unidad Irapuato por medio de la técnica de secuenciación por marcadores fluorescentes.

1.4. Análisis de homología y construcción de árboles filogenéticos

El análisis de homología de la secuencia de ADNr 16S de la cepa UM96 se realizó con el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Posteriormente con las secuencias homólogas de ADNr 16S recuperadas del anterior análisis (Tabla 2) se realizó un alineamiento con el programa CLUSTAL W2, para así, realizar la construcción de un árbol filogenético con el programa MEGA 5.0, utilizando el método del vecino más cercano y un Bootstrap de 1000.

|

Tabla 1. Características generales y específicas de los oligos utilizado						
Oligos	Secuencia ^a	Posiciones	Genes reconocidos	Tamaño de producto (pb)	Nº de acceso ^b	Referencia
Fd1	5'CAGAGTTTGAT	--	ADNr 16S	1500	--	Weisburg et al 1991
Rd1	5'AAGGAGGTGAT					
Lep2A	5'CCGAGAAAGTC	2158-2178	<i>cry1A</i>	890	--	Carozzi et al 1991
Lep2B	5'TACATGCCCTTT	3046-3066				
601F	5'TGATGTGAAAG	601-619	ADNr 16S ^c	--	CP001907.1	Este estudio
1201F	5'CATCATGCCCC	1201-1219				
27R	5'ACACTGGGACT	27-45				
929R	5'AAAGGAATTGA	929-947				
<i>Chi-f</i>	5'AATCACCCCA	151-171	<i>chi</i>	2166	HQ418216.1	Este estudio
<i>Chi-r</i>	5'TTACGTCTAGTT	1201-1221	<i>chi</i>		HQ418217.1	
					HQ418219.1	
					AF526379.1	
					AY129671.1	
					EF427670.1	

^ad y r oligos directos y reversos respectivamente

^bBase de datos GenBank

^cOligos de secuenciación interna para el de ADNr 16S (601F, 1201F, 27R y 929R)

1.5. Amplificación del gen *cry* de *Bacillus* sp. UM96

Para el aislamiento del gen *cry* de la cepa *Bacillus* sp. UM96 se utilizaron oligos universales Lep2A y Lep2B (Tabla 1), diseñados por Carozzi et al. (1991). Estos oligos se diseñaron para la amplificación de los genes del grupo *cry1A*. Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron: 95 °C durante 4 min para la desnaturalización inicial, 40 ciclos que consistieron de 95 °C/1 min, 42 °C/1 min y 72 °C/2 min, la temperatura final de extensión fue de 72 °C/10 min. Las

|

concentraciones en el tubo de reacción para este PCR así como su visualización se realizaron de la misma manera ya descrita en la sección 1.2. de materiales y métodos.

Tabla 2. Cepas de referencia para la construcción de árbol filogenético

Cepa	Numero de acceso del NCBI
<i>Bacillus thuringiensis</i> serovar <i>chinensis</i> CT-43	CP001907.1
<i>Bacillus cereus</i> G9842	CP001186.1
<i>Bacillus anthracis</i> str. A0248	CP001598.1
<i>Bacillus megaterium</i> QM B1551	CP001983.1
<i>Bacillus subtilis</i> BSn5	CP002468.1
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> LL3	CP002634.1
<i>Bacillus licheniformis</i> ATCC 14580	CP000002
<i>Bacillus halodurans</i> C-125	BA000004.3
<i>Listeria innocua</i> Clip11262	AL596173.1
<i>Listeria monocytogenes</i> EGD	AL591983.1

2. Caracterización fenotípica

Para la observación de un putativo cuerpo paraesporal en *Bacillus* sp. UM96 primeramente se indujo el proceso de esporulación con su crecimiento el medio mínimo basal (BM) reportado por Nickerson y Bulla (1974) que contiene $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.3 g; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.05 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.08 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.005 g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.0005 g; K_2HPO_4 , 0.5 g; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.0 g; y 1.0 g de glucosa por litro de agua destilada (pH ajustado a 7.4). UM96 se

|

mantuvo en medio BM a 30°C de 2 a 3 días. Posteriormente se tomó una muestra que fue fijada con calor y teñida con azul brillante de coomassie (azul de coomassie, 0.375 g; metanol, 120 ml; ácido acético, 30 ml; agua destilada, 150 ml) durante 5min. Se observó en microscopia óptica con aceite de inmersión a 100X (Rampersad et al. 2002).

3. Análisis de los mecanismos de la cepa UM96 para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos

3.1. Amplificación del gen *chi* de la cepa UM96

El aislamiento del gen *chi* se inició con la recuperación de secuencias que codifican para endoquitinasas en especies de *Bacillus thuringiensis* con la base de datos del NCBI. Se analizaron sus porcentajes de identidad con el programa BLASTn y posteriormente se realizó un alineamiento de las secuencias con el programa Clustal W2. Con este alineamiento y el uso del programa PriFi (Fredslund et al. 2005) se diseñaron los oligos *Chi-r* y *Chi-f* (Tabla 1). Los oligos *Chi-r* y *Chi-f* se diseñaron con la finalidad de amplificar el operon completo del gen *chi*. Las condiciones del termociclador para la reacción de PCR fueron una temperatura inicial de 95 °C, 3 min; y 40 ciclos de 95 °C, 1 min; 55 °C, 1 min y 72 °C, 2min. Con un ciclo final de extensión de 72 °C por 10 min.

|

3.2. Caracterización de actividad de enzimas líticas

La determinación de la actividad de enzimas líticas de la cepa UM96 se realizó en Laboratorio de Microbiología Ambiental del CINVESTAV Unidad Irapuato a cargo de Dr. Peña-Cabriales. Para medir la actividad de quitinasas se utilizaron dos tipos de sobrenadantes, que provienen del crecimiento de *Bacillus* sp. UM96 en dos tipos de cultivos diferentes: caldo nutritivo (CN) y un medio mínimo cuya única fuente de carbono es quitina (MQ), el cual consiste de: Na_2HPO_4 , 6 g; KH_2PO_4 , 3.0 g; NH_4Cl , 1 g; NaCl , 0.5 g; extracto de levadura, 0.05 g; quitina 1.0% (w/v); agar, 15 g y agua destilada, hasta un volumen final de 1000 ml (Kamil et al. 2007).

Se inoculó a *Bacillus* sp. UM96, con 250 μl de un preinóculo de la cepa a 1.5 $\text{OD}_{600\text{nm}}$, en 250 ml de cada uno de los medios (CN y MQ) y se mantuvieron a 30 °C a 150 rpm durante 4 días. Para obtener los sobrenadantes de *Bacillus* sp. UM96 se centrifugó a las dos condiciones de cultivo a 10,000 rpm por 2 min, para así tener el sobrenadante CN y sobrenadante MQ, libre de células.

Para analizar la presencia de actividad de enzimas líticas quitinasas, celulasas, y glucanasas se siguieron los protocolos de Suresh y Chandrasekaran (1998); Ghose (1987); Kulminskaya et al. (2001), respectivamente. Se utilizó el sobrenadante CN para analizar la actividad de las 3 enzimas, mientras que el sobrenadante MQ se utilizó para tener actividad de quitinasas. En todos los casos se tomó 1 ml de cada sobrenadante y se adicionó 2 ml de buffer de fosfato-citrato 0.1 M (pH 4.4) y 0.5 mg del sustrato correspondiente ya sea celulosa, quitina o

|

laminarina según la reacción que se trate (celulasa, quitinasa y glucanasa, respectivamente). Como control se utilizó la misma reacción antes mencionada sólo que no se colocó ningún tipo de sustrato.

Posteriormente, los tubos se dejaron incubar en baño María a diferentes temperaturas y tiempos. En el caso de los tubos donde se deseó medir actividad de celulasas se incubó a 50 °C por 60 min, para quitinasas 37 °C por 40 min y finalmente para la actividad de glucanasas a 37 °C por 20 min. Se midió la actividad enzimática al adicionar 1ml de reactivo de Miller (1959), que posee ácido dinitrosalicílico (DNS) 1 g; SO_3Na_2 , 0.05 g; NaOH, 1 g; fenol, 0.2 g; agua destilada, 100ml) e incubar a 100 °C durante 10 min. Se permitió enfriar y se colocó a cada tubo 1 ml de Sales de Rochelle al 40 %.

Las moléculas de azúcar liberadas que actúan como agentes reductores sobre el DNS, se midieron en un espectrofotómetro (GENios XFLUOR 4 Versión V 4.51) a 565 nm. Para el cálculo de las unidades enzimáticas se utilizó una curva de calibración con concentraciones conocidas de N-acetil-D-glucosamina y glucosa como estándares en cada caso. Donde una unidad de actividad se definió como la cantidad de actividad enzimática en 1 ml de sobrenadante que libera 1 μmol de N-acetilglucosamina o glucosa por minuto. El rendimiento enzimático se expresó como $\mu\text{mol/ml}$ sobrenadante/min.

|

3.3. Comparación de la actividad antifúngica del sobrenadante de la cepa UM96 con quitinasa pura

Se utilizaron los dos tipos de sobrenadantes CN y MQ, con los que, anteriormente se midió la actividad de enzimas líticas. Esta vez, para medir la actividad antifúngica de los sobrenadantes, se colocó y plaqueo 1 ml de cada uno en placas con Agar Papa Dextrosa (PDA). Como parámetro de comparación en la actividad antifúngica se utilizó quitinasa pura (SIGMA) de *Streptomyces griseus* y se colocó en cajas de PDA en las concentraciones: 0.8, 0.6, 0.4 y 0.2 U/mg de proteína. Adicionalmente para inhibir la actividad proteica de los sobrenadantes CN y MQ se incubaron en baño María a temperaturas de 50, 60 y 70 °C durante 60 min, 1 ml de cada una de estas condiciones de ambos sobrenadantes, también se plaqueo en cajas de PDA. Para medir la actividad antifúngica de sobrenadantes y quitinasa pura se colocó 4 mm de diámetro del micelio del hongo *Botrytis cinerea* en el centro de cada caja

4. Ensayo de colonización de la rizósfera de maíz por la cepa UM96

El ensayo de colonización de la rizósfera de maíz por UM96 se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Scher et al. (1983) sin ninguna modificación. El método consistió en la preparación del inóculo por medio de un cultivo de la cepa UM96 previamente crecido en cajas con AN a 30 °C por 24 h, se colocaron alrededor de

|

10 semillas de maíz sin esterilizar, en cada caja y 10 ml de MgSO_4 0.1 M estéril, las semillas se mantuvieron en esa suspensión bajo agitación de 2 a 3 h a 25 °C.

Posteriormente se tomaron de manera aleatoria 3 semillas de cada condición y cada grupo se dejó en agitación en 9 ml de MgSO_4 0.1 M estéril, de dicha suspensión se plaquearon 100 μl las diluciones 10^{-2} y 10^{-3} cada dilución se plaqeo por duplicado, para tener finalmente 4 replicas tanto para las semillas inoculadas como para las semillas control. Las cajas se mantuvieron a 30 °C de 24 a 42 h, para posteriormente realizar el conteo de unidades formadoras de colonia (CFU) y se reportó como CFU/ml.

Las semillas que no se utilizaron para medir la cantidad de CFU del inóculo inicial, se utilizaron para los posteriores análisis. Cada semilla se colocó para su germanización y crecimiento, en un tubo (25 x 200 mm) con 6 cm de arena y 5 ml de agua y 2 cm de suelo. Las semillas fueron mantenidas en condiciones controladas en una cámara de crecimiento Percival con un ciclo 16 h luz/8 h oscuridad y una intensidad de luz de $200 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ a 22 °C por 30 días. Se realizaron los siguientes tratamientos: i) semillas inoculadas sembradas en suelo, ii) semillas inoculadas sembradas en suelo estéril. Cada tratamiento se realizó con 10 semillas. En la Figura 8 se muestra el resultado de este sistema a 10 días de haber iniciado cada tratamiento.

La esterilización del suelo se realizó en una olla a presión a 103 kPa y 121 °C durante 1 h, este proceso se repitió 24 h después. Pasados 30 días se recuperó

|

0.1 g de suelo rizosférico de cada planta de cada tratamiento, y se suspendió en 1 ml de MgSO_4 0.1 M estéril, para realizar diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} , de cada dilución se tomaron 100 μl y se plaquearon en cajas de AN adicionadas con 10 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina. Cada dilución se plaqueó por duplicado, para finalmente obtener 4 cajas plaqueadas para cada planta de cada tratamiento. Las cajas se incubaron a 30 °C de 24 a 48 h. Finalmente se realizó el conteo de CFU recuperado de cada caja y se reporto como CFU/g de suelo rizosférico.

5. Análisis de la capacidad de biocontrol de la cepa UM96

5.1. Condiciones de crecimiento de las plantas

Se utilizaron plantas de *Medicago truncatula* ecotipo Jemalong (A17-1), las semillas se escarificaron con ácido sulfúrico concentrado y se realizaron 6 lavados con agua desionizada estéril (Orozco-Mosqueda et al. 2013b). Para la desinfección de las semillas se coloraron en una solución de hipoclorito al 12 % por 2 min, el exceso de hipoclorito se lavó con agua destilada estéril. Las semillas se germinaron en cajas con medio Murashige-Skoog (MS) con 0.6 % de fitagar en una cámara de crecimiento Percival con la condiciones anteriormente descritas.

|

5.2. Ensayo de biocontrol de la cepa UM96

Para el establecimiento del ensayo de biocontrol se utilizaron plántulas de *M. truncatula* de 5 días después de la germinación. Las plántulas se trasplantaron de manera individual en frascos con una capacidad de 170 ml, (Orozco-Mosqueda et al. 2013b) que contenían 25 ml de MS adicionado con 10 % de Agar Nutritivo (AN) con la finalidad de favorecer el crecimiento del inóculo bacteriano.

Después de 8 días de adaptación de las plantas en este sistema se prosiguió a la infección de plantas sanas con la inoculación de esporas de *B. cinerea* (Ellwood et al. 2006). Para la preparación del inóculo de *B. cinerea*, el hongo se creció en PDA de 10-15 días y se recuperaron las esporas en agua destilada estéril en una concentración de 1×10^6 esporas/ml. El conteo de esporas se realizó con una cámara de Neubauer en un microscopio óptico con un aumento de 40 X.

La preparación del inóculo bacteriano se realizó al crecer a la cepa UM96 en 5 ml de CA a 30 °C hasta alcanzar una OD_{600nm} de 0.5 nm. Los tratamientos del ensayo fueron: plantas control sin inocular, plantas infectadas con *B. cinerea*, plantas infectadas con *B. cinerea* y tratadas con UM96, y plantas inoculadas con UM96. Los inóculos: 50 µl de UM96 y 30 µl de *B. cinérea*, con las concentraciones ya mencionadas se colocaron en la superficie de la raíz de manera simultánea.

Los parámetros para medir el desarrollo de la infección causada por *B. cinerea* en *M. truncatula* fueron porcentaje de hojas infectas (PLI) y porcentaje de pudrición de la raíz (PR).

|

PLI= Número de hojas infectadas/Número de hojas observadas x 100; PR= Longitud de pudrición de la raíz/longitud de raíz x 100. Además se midió el peso fresco de la parte aérea y de la raíz.

5. Análisis estadístico

El efecto de los tratamientos se determinó con análisis de varianza (ANOVA una variable) con el programa Statistica 6.0 (Statsoft Inc. 2001). Las medias se separaron con la prueba de Tukey con $p < 0.05$ o bien t de student $p < 0.05$, según el caso.

RESULTADOS

1. Identificación de la cepa UM96

1.1. Análisis de la secuencia del gen de ADNr 16S

La especie a la que pertenece la cepa *Bacillus* sp. UM96 se determinó con herramientas moleculares y fenotípicas. Dentro de la caracterización molecular se amplificó el gen de ADNr 16S con los oligos universales Fd1 y Rd1. En la Figura 4 se muestra el producto de la reacción de PCR con estos oligos. Se observó una única banda de aproximadamente 1500 pb, indicativa del gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96.

|

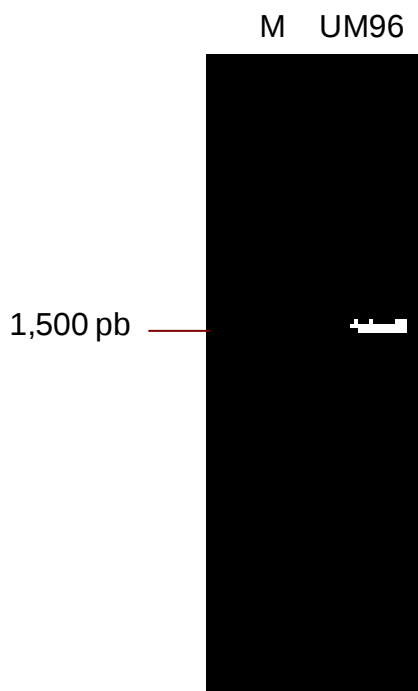


Figura 4. Amplificación del gen de ADNr 16S de *B. thuringiensis* UM96. Carril M marcador de tamaño molecular 1Kb de 10,000 pb; Carril UM96 gen de ADNr 16S de *B. thuringiensis* UM96.

La secuenciación del gen se realizó con los oligos de secuenciación interna: 601F, 1201F, 27R y 929R (Tabla 1). Como resultado se reportó una secuencia 1541 pb, que comprende la secuencia completa del gen ADNr 16S de la cepa *Bacillus* sp. UM96.

Posteriormente para obtener los porcentajes de identidad de este gen con otras especies de *Bacillus*, se realizó el análisis de la secuencia con el programa BLASTn. El gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96 mostró identidad alta de 99% tanto a especies de *B. thuringiensis* y a especies de *B. cereus* (Tabla 3).

Tabla 3. Porcentajes de identidad del gen de ADNr 16S de *B. thuringiensis* UM96. Muestra representativa de un análisis tipo BLASTn.

AT Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results					
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value Ident
☐	Bacillus thuringiensis HD-771, complete genome	2817	33607	100%	0.0 99%
☐	Bacillus thuringiensis serovar chinensis CT-43, complete genome	2817	39407	100%	0.0 99%
☐	Bacillus cereus G9842, complete genome	2817	36519	100%	0.0 99%
☐	Bacillus cereus strain G8639 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2813	2813	100%	0.0 99%

Estos porcentajes de identidad tan altos entre estas especies son comunes, ya que ambas pertenecen al grupo de *Bacillus cereus sensu lato* (Ash et al. 1991). En este grupo, el gen de ADNr 16S, no es suficiente para diferenciar entre las especies que lo conforman (Helgason et al. 2004). Por lo que la secuencia de ADNr 16S no es suficiente para identificar la especie a la que *Bacillus* sp. UM96.

No obstante se observó en el árbol filogenético (Fig. 5) que la cepa UM96 forma un grupo separado con una especie de *B. thuringiensis*. Esto puede sugerirnos que *Bacillus* sp. UM96 se encuentra más estrechamente relacionada con especies de *B. thuringiensis*. Aún así, fue necesario realizar estudios fenotípicos para poder determinar a cuál de especie pertenece *Bacillus* sp. UM96.

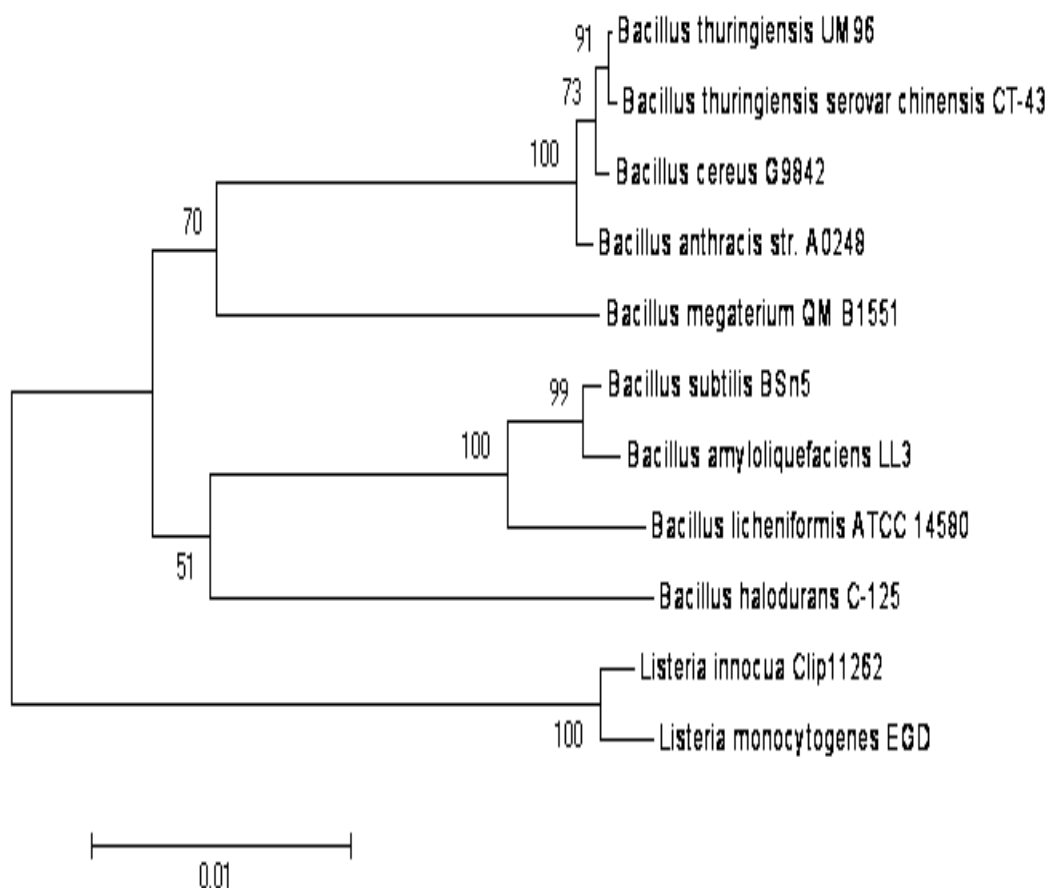


Figura 5. Relación filogenética de *B. thuringiensis* UM96 con otras bacterias del género *Bacillus*. El árbol filogenético fue construido con secuencias completas del gen de ADNr 16S por medio del método del vecino más cercano, con un bootstrap de 1000 repeticiones. Especies de *Listeria* fueron usadas como grupo externo.

1.2. Caracterización del cuerpo paraesporal de la cepa UM96

B. thuringiensis se separa como especie del grupo de *B. cereus* por su capacidad de ser patógena de insectos (Helgason et al. 2000; Rasko et al. 2005). Como se expuso anteriormente, la ocupación de este nicho por parte de *B. thuringiensis*, se debe a la síntesis de un cuerpo paraesporal durante la diferenciación en endosporas (Jensen et al. 2003). Para facilitar la visualización de un putativo

|

cuerpo paraesporal se indujo el proceso de esporulación al crecer a *Bacillus* sp. UM96 en el medio mínimo BM. Posteriormente, se tomó una muestra bacteriana para observar por microscopía óptica al teñir con azul de coomassie. En la Figura 6 se muestran los cuerpos paraesporales obtenidos después del crecimiento en medio mínimo BM.

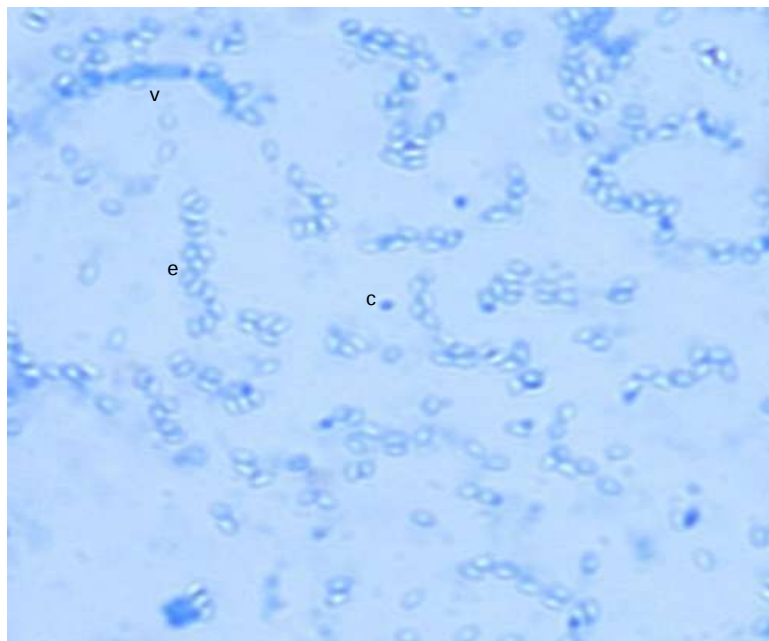


Figura 6. Cuerpo parasporal de *B. thuringiensis* UM96. Se observan varias endosporas (e) elipsoidales, cuerpos parasporales (c) ovalados y células vegetativas (v) de *B. thuringiensis* UM964. Microscopía óptica 100X tinción con azul de coomassie.

En estas fotografías es posible observar un gran número de endosporas marcadas con la letra **e**, las cuales presentan una forma elíptica. Por tanto, el crecimiento de *Bacillus* sp. UM96 en el medio BM indujo la formación de endosporas. También se observó, en menor medida, células vegetativas (**v**) y los cuerpos paraesporales (**c**), los cuales presentan una forma ovalada pequeña. Esta morfología

|

corresponde a una forma poco común en el cuerpo paraesporal, pero sin embargo, ya ha sido reportada anteriormente (Rampersad & Ammons 2005). En resumen, con el análisis de identidad del gen de ADNr 16S de la cepa UM96, que la ubica dentro del grupo de *B. cereus* (Tabla 3); la relación filogenética del gen de ADNr 16S de *Bacillus* sp. UM96, más cercana hacia la especie *B. thuringiensis* (Fig. 5) y la presencia del cuerpo paraesporal (Fig. 6), se logró la identificación de *Bacillus* sp. UM96 como una especie de *B. thuringiensis*.

1.3. Presencia de genes *cry* en *B. thuringiensis* UM96

Los genes *cry* que codifican el cuerpo paraesporal en la especie de *B. thuringiensis*, son ampliamente estudiados y existe un gran interés en la identificación de nuevos genes *cry* (Shu et al. 2013), por tanto y con el propósito de enriquecer nuestros resultados, proseguimos a la amplificación de los genes *cry* en el genoma de *B. thuringiensis* UM96. Para lo cual se utilizaron los oligos universales para genes *cry* Leb2A y Lep2B que amplifican los genes *cry1A* (Carozzi et al. 1991). El producto de PCR con estos oligos se muestra en la Figura 7, en donde se observa la banda del peso esperado de aproximadamente 890pb. Esto nos indica la presencia de genes *cry* en *B. thuringiensis* UM96. Debido a que los genes *cry* son específicos para la especie *B. thuringiensis* (Bravo et al. 1998), la amplificación de genes *cry* en la cepa UM96 nos permite confirmar su identificación como una especie de *B. thuringiensis*. Además podemos sugerir que *B. thuringiensis* UM96 puede tener genes de grupo *cry1A* sin embargo es

|

necesario llevar a cabo la purificación y secuenciación del gen.

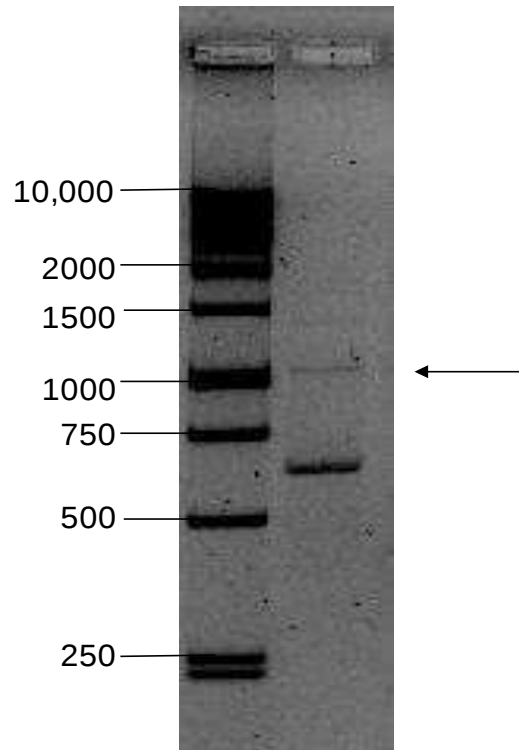


Figura 7. Amplificación del gen *cry1A* de *B. thuringiensis* UM96. Carril M marcador de tamaño molecular 1Kb de 10,000 pb. La flecha indica la banda del peso esperado para el gen *cry1A* de *B. thuringiensis* UM96.

2. Mecanismos de *B. thuringiensis* UM96 para inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos

2.1. Amplificación del gen *chi* de endoquitinasas en *B. thuringiensis* UM96

Las quitinasas de la especie de *B. thuringiensis* han sido involucradas en su mecanismo de inhibición de hongos fitopatógenos (Morales de la Vega et al. 2006; Reyes-Ramírez et al. 2006; Gomaa 2012). Debido a ello, nos planteamos el

|

objetivo de detectar el gen *chi* en *B. thuringiensis* UM96, que codifica para endoquitinasas.

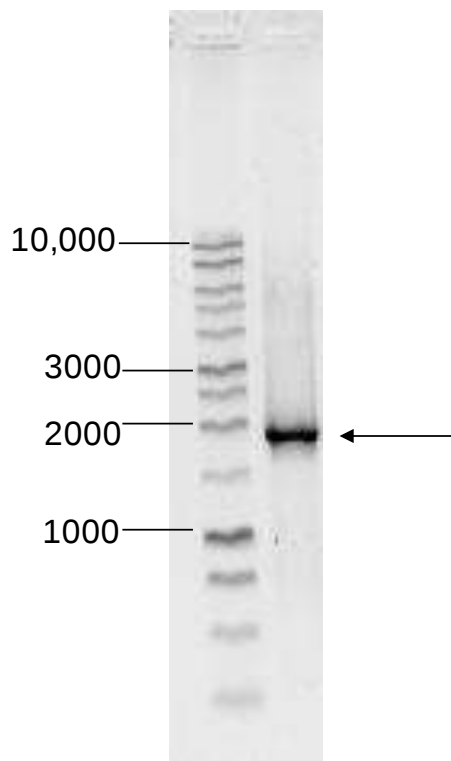


Figura 8. Amplificación por PCR del gen *chi* de *B. thuringiensis* UM96. Carril M marcador de tamaño molecular 1Kb de 10,000 pb. La flecha indica la banda del peso esperado para el gen *chi* de *B. thuringiensis* UM96.

Esto se realizó por PCR, usando los oligos *Chi-f* y *Chi-r* (Tabla1). Como resultado, en la Figura 8, se observó el producto de PCR con una única banda de un peso aproximado al esperado de 2000 pb.

Debido a que no se encontraron inespecificidades en el producto de PCR y que los oligos *Chi-f* y *Chi-r* se diseñaron de manera específica para el gen *chi* de endoquitinasas de *B. thuringiensis*, podemos sugerir que *B. thuringiensis* UM96

|

contiene en su genoma un gen *chi* de endoquitinasas. Aunque aún debe obtenerse la secuencia de DNA para confirmarlo.

2.2. Actividad de enzimas líticas en *B. thuringiensis* UM96

Debido a que las enzimas líticas se han reportado como mecanismos de inhibición de fitopatógenos (Glick 2012), se analizó la actividad de las celulasas, glucanasas y quitinasas en *B. thuringiensis* UM96. La actividad de enzimas líticas se midió por medio de un método colorimétrico (Miller 1959) con el sobrenadante CN de *B. thuringiensis* UM96 que proviene de su crecimiento en caldo nutritivo. Como resultado *B. thuringiensis* UM96 mostró actividad de quitinasas (Fig. 9), no obstante la actividad de glucanasas y celulasas resultó ausente.

En organismos como *Streptomyces*, *Serratia*, *Bacillus* y *Actinomycetes* la presencia de quitina en el medio o caldo de cultivo aumentó la actividad de la quitinasa (Gomes et al. 2000; Swiontek 2013, Arora et al 2003; Barboza-Corona et al. 2008). Con la finalidad analizar si la presencia de quitina en el medio logra aumentar la actividad de quitinasas en *B. thuringiensis* UM96, se analizó la actividad de quitinasa en sobrenadante MQ, que proviene del crecimiento de *B. thuringiensis* UM96 en un medio con quitina como única fuente de carbono. La actividad de quitinasa en el caso del sobrenadante de CA fue de aproximadamente 0.2 U, mientras que la actividad de quitinasa fue notablemente más alta al crecer a *B. thuringiensis* UM96 en el medio MQ, llegando hasta aproximadamente 0.5 U (Fig. 9).

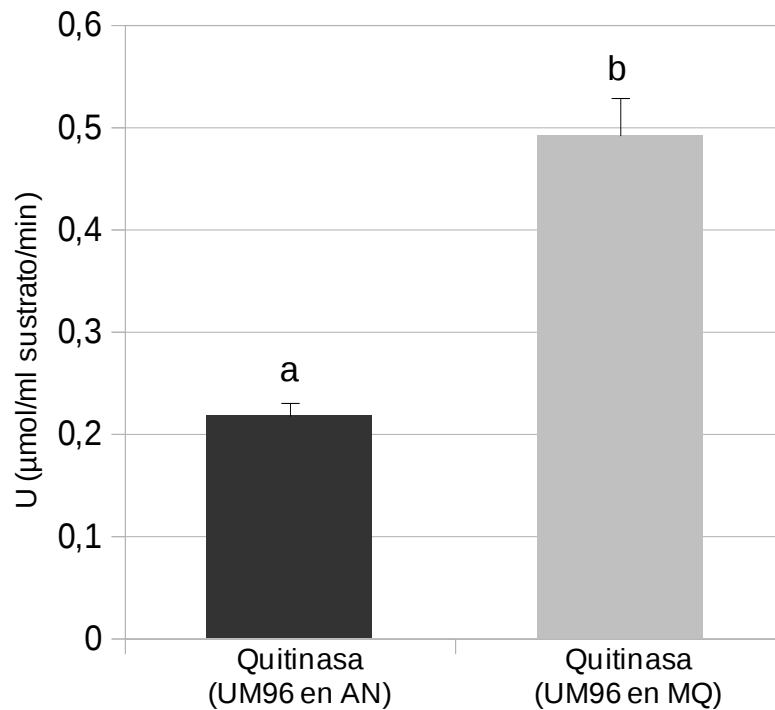


Figura 9. Actividad de quitinasa de *B. thuringiensis* UM96. Las mediciones en la actividad enzimática se realizaron en los sobrenadantes obtenidos del crecimiento de *B. thuringiensis* UM96 en caldo nutritivo (UM96 CN) y en medio con quitinas como única fuente (UM96 MQ). Media $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) $n=6$.

La actividad que encontró en el sobrenadante MQ fue de más del doble de actividad enzimática en comparación a la actividad en el sobrenadante CA (Fig. 9). Esto nos indica que *B. thuringiensis* UM96 presentó actividad de quitinasas, la cual fue más alta al crecer la cepa en un medio con quitina como única fuente de carbono (sobrenadante MQ).

|

2.3. Actividad antifúngica del sobrenadante de *B. thuringiensis* UM96

Una vez establecido que *B. thuringiensis* UM96 presentó el gen *chi* de endoquitinasa (Fig. 8) y que en ambos sobrenadantes (sobrenadante CN y sobrenadante MQ) se encontró actividad de quitinasa (Fig. 9), se prosiguió a analizar la actividad antifúngica de los dos tipos de sobrenadantes obtenidos CN y MQ, contra el hongo *Botrytis cinerea*.

Además, se comparó la actividad antifúngica de ambos sobrenadantes con quitinasa pura comercial (Hoster et al. 2005), con la finalidad de tener elementos que nos den información sobre el papel que tiene la actividad de quitinasa de *B. thuringiensis* UM96 sobre su capacidad antifúngica. Adicionalmente, con la finalidad de inhibir o eliminar la actividad de los sobrenadantes se incubaron a temperaturas de 50, 60 y 70 °C, para establecer si la actividad del sobrenadante se debe a actividad proteica.

La quitinasa pura disminuyó el crecimiento de *B. cinerea* de manera dependiente a la concentración de quitinasa. La mayor disminución en el crecimiento se presentó en la concentración de quitinasa comercial de 0.8 U/mg de proteína que provocó un crecimiento de sólo un 32 % del micelio del hongo (Fig. 10).

Los sobrenadantes que se obtuvieron de los medios CN y MQ sin ningún tratamiento disminuyeron el crecimiento del hongo de manera significativa, y el crecimiento fue estadísticamente similar con ambos tratamientos. Además, la aplicación del sobrenadante MQ provocó un crecimiento de sólo el 37 % en el hongo *B. cinérea*, esta disminución fue mayor en comparación con la aplicación

|

del sobrenadante CN, en donde el hongo crece en un 41 % (Fig. 10).

Cabe resaltar que la disminución en el crecimiento de *B. cinerea* por el efecto de los sobrenadantes CN y MQ, fue similar a la disminución que generó la concentración más alta de quitinasa pura (0.8 U/mg de proteína) (Fig. 10).

Por otro lado, los sobrenadantes incubados a 50 °C (CN y MQ) mantuvieron la actividad antifúngica, la cual fue inclusive muy similar a los sobrenadante sin ningún tratamiento; esto fue más notable en el sobrenadante MQ a 50 °C, en donde el hongo sólo creció en un 39 % y fue estadísticamente igual a los sobrenadantes no incubados; en cuanto a el sobrenadante CN incubado a 50 °C el hongo creció en un 48 %, lo que generó un crecimiento en el micelio estadísticamente mayor al se presentó en los sobrenadantes CN, MQ y MQ incubado a 50 °C (Fig. 10).

A temperaturas de incubación de 60 y 70 °C se observó que ambos sobrenadantes, pierden significativamente la actividad antifúngica, mostrando crecimientos estadísticamente iguales a los del hongo control sin ningún tratamiento, con un crecimiento del 88 % en CN y del 85 % en MQ. En cuanto a la incubación con 70 °C, el crecimiento *B. cinerea* fue un poco mayor, pero estadísticamente igual al control (97 % en CN y 96 % en MQ) (Fig. 10).

El sobrenadante MQ mantuvo la tendencia de disminuir más el crecimiento del *B. cinerea* en comparación a el sobrenadante CN, y el sobrenadante MQ incubado a 50 °C significativamente disminuyó en mayor medida y el crecimiento del hongo en comparación al sobrenadante CN (Fig. 10), esto pudo deberse a que en el

sobrenadante MQ se encontró mayor actividad de quitinasa (Fig. 9).

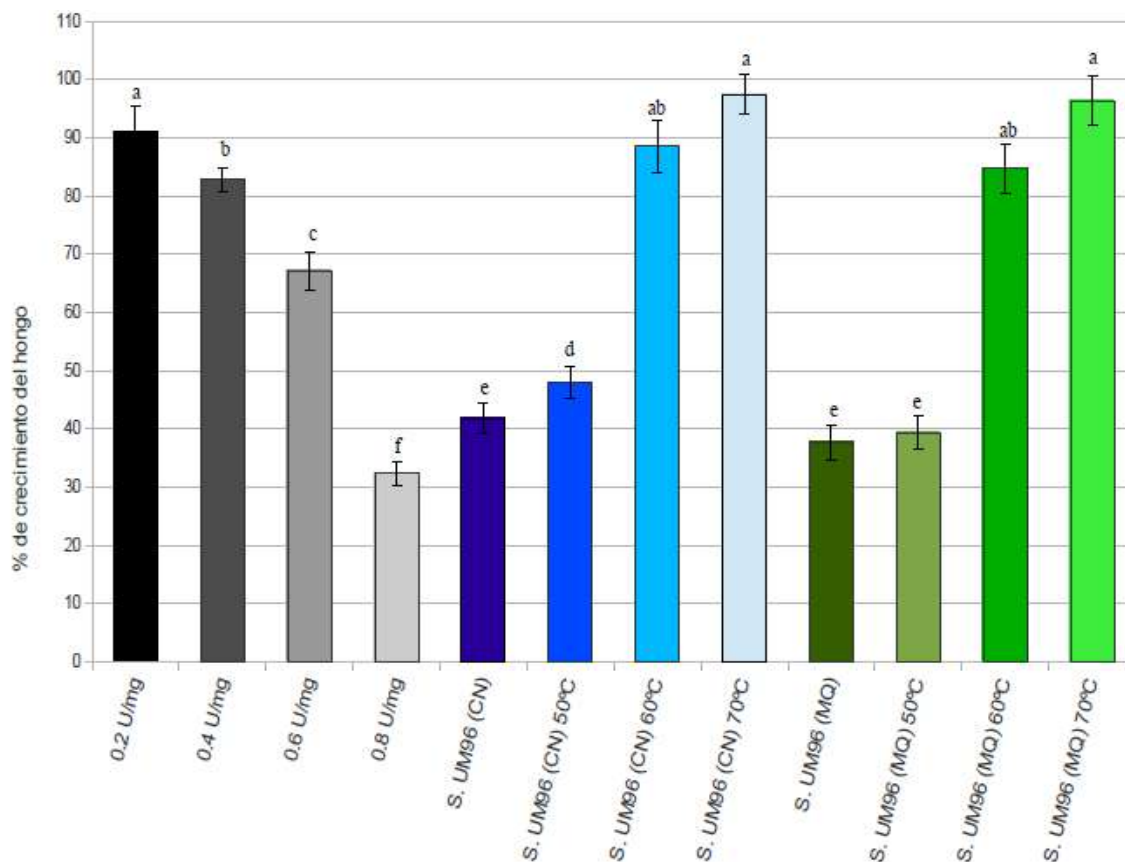


Figura 10. Actividad del sobrenadante de *B. thuringiensis* UM96 sobre el hongo *B. cinerea*. Porcentaje de crecimiento de *B. cinerea* = crecimiento del hongo control / crecimiento del hongo en el tratamiento correspondiente x 100. Tratamientos: Quitinasa pura comercial (barras negras a gris); sobrenadante de *B. thuringiensis* UM96 crecido en CN (S. UM96 CN) e incubado a 50, 60 y 70°C (barras azules); sobrenadante de *B. thuringiensis* UM96 crecido en MQ (S. UM96 MQ) e incubado a 50, 60 y 70°C (barras verdes). ± ES. Letras diferentes indica diferencia significativa (prueba Tukey $p < 0.05$) $n=6$.

Además, ambos tipos de sobrenadantes mantuvieron una actividad antifúngica parecida a la concentración más alta de quitinasa pura. Mientras que, las temperaturas de incubación en las que los sobrenadante mantuvieron y perdieron su actividad antifúngica, concuerdan con la estabilidad y actividad de las quitinasas a estas temperaturas (Barboza-Corona et al. 2008; Rosas-García et al.

|

2013). Todo ello permite sugerir que la actividad de quitinasa de los sobrenadantes podría participar en la actividad antifúngica de *B. thuringiensis* UM96.

3. Capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96

3.1. *B. thuringiensis* UM96 puede colonizar la rizósfera de plantas de maíz

Una de las cualidades de las cepas exitosas en el biocontrol de fitopatógenos es su capacidad de colonización de la rizósfera de las plantas. (Kamilova et al. 2005; Vidal-Quist et al. 2013). Es por eso que es importante revisar que *B. thuringiensis* UM96 mantenga esta capacidad.

Se analizó la capacidad de colonización *B. thuringiensis* UM96 en plantas de maíz, que se mantuvieron en suelo, o en suelo tratado en autoclave (ver materiales y métodos). En la Figura 11 se observa, el desarrollo, hasta el decimo día, del sistema que se utilizó, el cual se fundamenta, en el crecimiento del inóculo en un medio pobre (arena), de tal manera que su presencia en la zona de la arena (su alta densidad) se explica debido a su capacidad de colonizar la rizósfera de esta zona (Scher et al. 1984). *B. thuringiensis* UM96 se inoculó en las semillas de maíz en una densidad inicial de 1×10^4 a 1×10^5 CFU/ml (Fig. 12). Después de 30 días de crecimiento, la densidad de CFU de las plantas que se mantuvieron en suelo rizosférico, fue de aproximadamente 1×10^7 CFU/g de suelo de rizosférico (Fig. 12).



Figura 11. Ensayo de colonización de *B. thuringiensis* UM96 en plantas de maíz. Sistema de colonización de rizósfera a los 10 días de inoculación.

La densidad de CFU que se encontró en el suelo rizosférico estéril fue muy similar, también de aproximadamente 1×10^7 CFU/g de suelo de rizosférico. La alta densidad de CFU en las dos condiciones de suelo rizosférico que se utilizaron, nos permite concluir que *B. thuringiensis* UM96 logró colonizar la rizósfera de maíz.

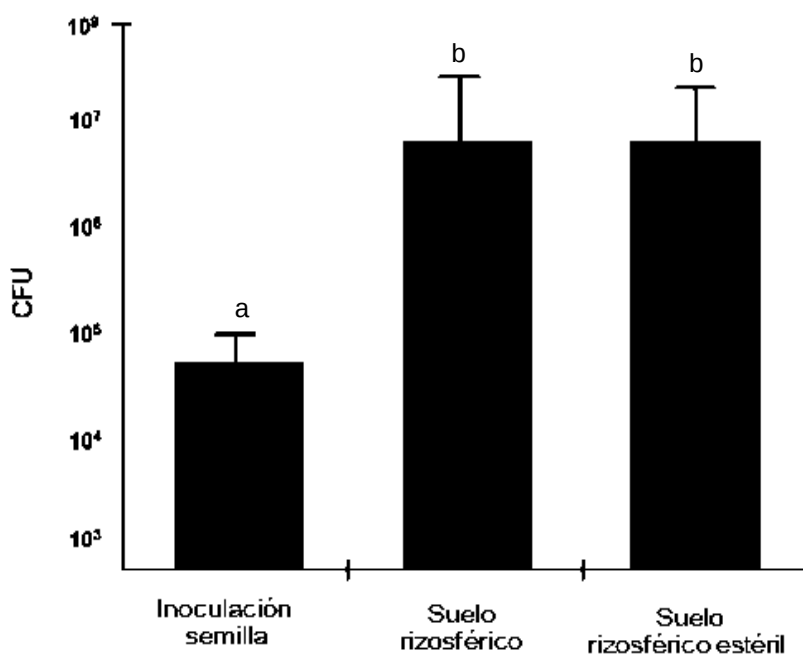


Figura 12. *B. thuringiensis* UM96 coloniza de la rizósfera de maíz. Inoculación de *B. thuringiensis* UM96 en semillas de maíz (Inoculación semilla). Número de CFU recuperado de la rizósfera 30 días después de la inoculación en ambos tratamientos (suelo rizosférico y suelo rizosférico estéril). Media $\pm$ DS. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$) $n = 10$.

3.2. *B. thuringiensis* UM96 muestra capacidad de biocontrol del hongo *B. cinerea* en plantas de *M. truncatula*

La capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96 se analizó en un ensayo *in vitro* con plantas de *M. truncatula* que se infectaron con el hongo *B. cinerea*.

En la Figura 13 se observa el efecto que tuvo la inoculación de los microorganismos de forma separada. La inoculación de *B. thuringiensis* UM96 en las plantas, no presentó un efecto significativo en la biomasa, ya que tanto el peso de la parte aérea (Fig. 13 panel A), como el peso de la raíz (Fig. 13 panel B) fue estadísticamente similar con respecto a las plantas control sin ningún tratamiento.

|

Por otra parte, la inoculación con el hongo fitopatógeno *B. cinerea* disminuyó de manera significativa el peso fresco de la parte aérea (Fig. 13 panel A) y el peso fresco de la raíz (Fig. 13 panel B) en las plantas de *M. truncatula*, en comparación a las plantas control.

Las plantas infectas con *B. cinerea* que se trataron con *B. thuringiensis* UM96, tuvieron pesos de la parte aérea similares a las plantas control sin ningún tratamiento (Fig. 13 panel A).

Al analizar la raíz de las plantas infectadas e inoculadas con *B. thuringiensis* UM96, se encontraron pesos frescos estadísticamente menores al de las a plantas control (Fig. 13 panel B). De manera visual se observó la disminución en los síntomas de la infección en las plantas tratadas con *B. thuringiensis* UM96 (Fig. 13 panel F), en comparación a las plantas que se infectaron con el hongo, sin ningún tratamiento (Fig. 13 panel C). Es apreciable la ausencia del crecimiento del moho gris sobre la raíz, tallos sanos, así como una disminución importante en las hojas necróticas (Fig. 13 panel C y F). Finalmente también es posible observar en el panel D y G de la Figura 13 que en las plantas inoculadas con *B. thuringiensis* UM96 no hay diferencia en su crecimiento, en comparación con las plantas control. Todo ello nos indica que *B. thuringiensis* UM96 pudo disminuir de manera significativa la infección de *B. cinerea*.

En cuanto a los parámetros de porcentaje de infección de las hojas (PLI) y porcentaje de crecimiento del moho gris sobre la raíz (PR) (Fig. 14) *B. thuringiensis* UM96 disminuyó de manera significativa la infección de *B. cinerea*

sobre *M. truncatula*, en ambos parámetros (PLI y PR), con respecto a las plantas infectadas (Fig. 14 panel A).

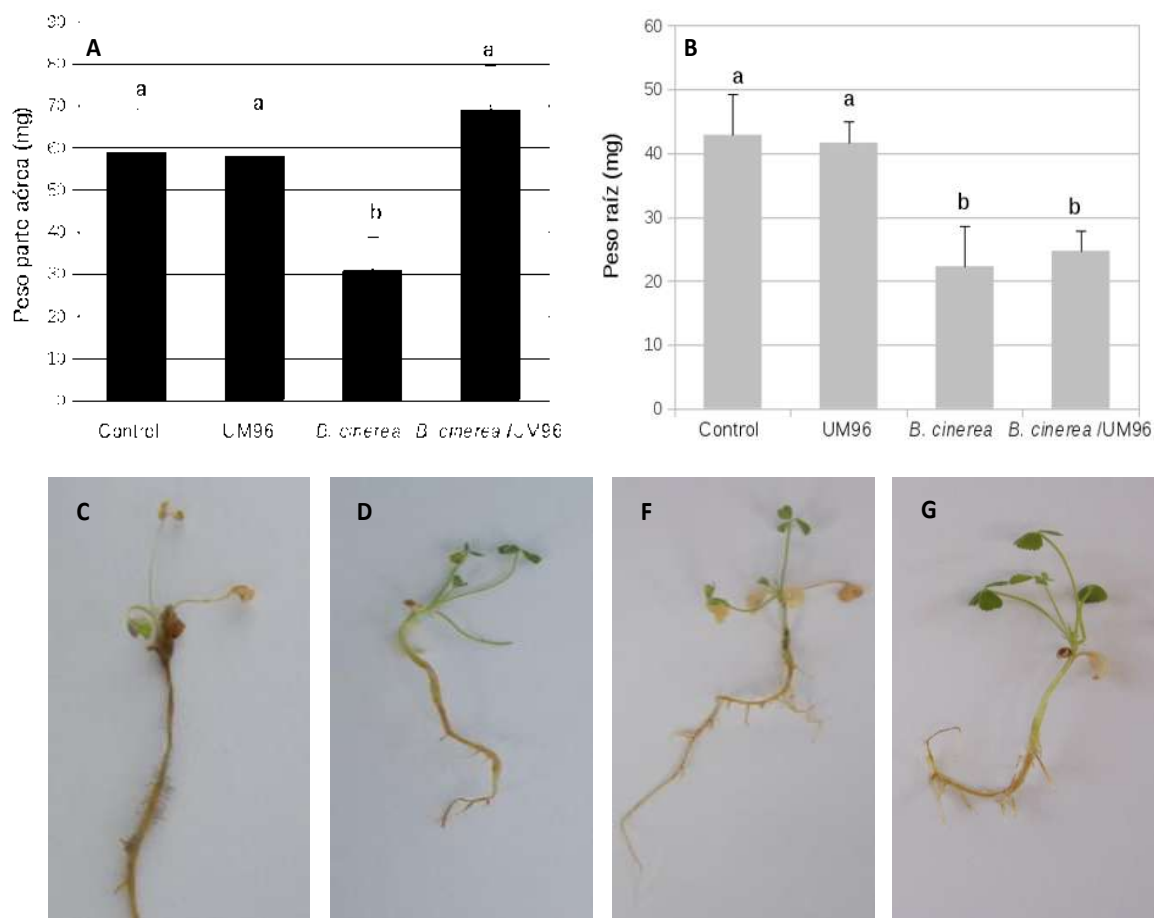


Figura 13. Actividad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96 hacia el hongo fitopatógeno *B. cinerea* en plantas de *M. truncatula*. Capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96 sobre la infección de *B. cinerea* en *M. truncatula*. Peso fresco de la parte aérea (A), peso fresco de las raíz (B). Media $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencia significativa (Tukey $p < 0.05$) $n=9$. Infección de *B. cinerea* sobre *M. truncatula* (C); plantas infectadas y tratadas con *B. thuringiensis* UM96 (D); plantas inoculadas con *B. thuringiensis* UM96 (F) y plantas control sin ningún tratamiento (G)

Las fotografías representativas (Fig. 14) de los paneles B y C refieren a las plantas infectadas dentro de los frascos que se utilizaron en el sistema de este ensayo; en

las plantas infectadas se observa claramente una disminución en el crecimiento de la planta, sobre todo en la parte aérea de la misma, también es posible observar el crecimiento del hongo sobre todo el medio MS contenido en el frasco. Por otro lado las fotografías de los paneles D y E refieren a las plantas infectadas y tratadas con la cepa UM96; es claramente visible un mayor crecimiento en estas plantas, además fue interesante observar la disminución en el crecimiento del hongo e inclusive es de notar que el hongo no logro crecer sobre el MS.

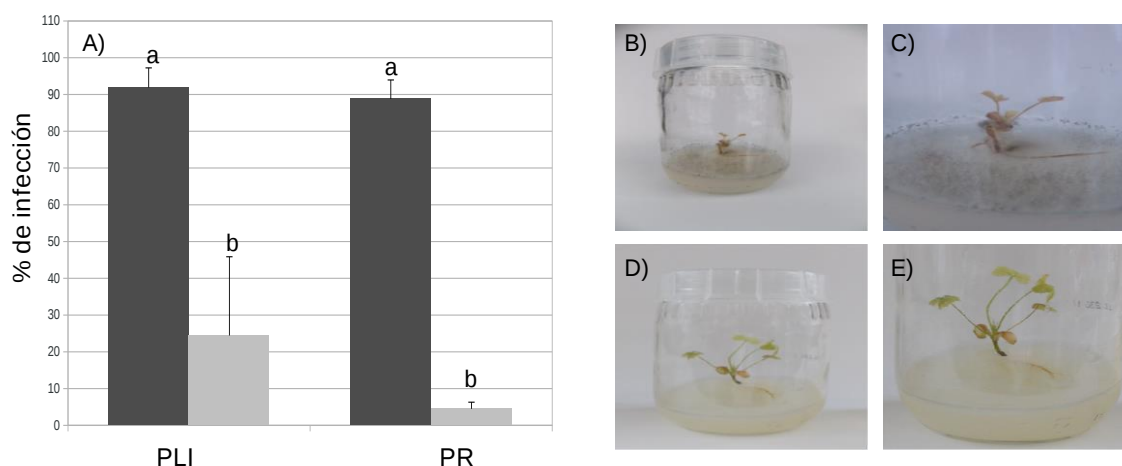


Figura 14. *B. thuringiensis* UM96 protege a *M. truncatula* de la infección de *B. cinerea*. *M. truncatula* infectada con *B. cinerea* (■) y tratada con *B. thuringiensis* UM96 (□) en los parámetros PLI (porcentaje de hojas infectadas) PR (porcentaje de moho gris sobre la raíz) Media $\pm$ DE. Letras diferentes indican diferencia significativa (t de Student, $p < 0.05$) $n=9$. Fotografías representativas del ensayo en los frascos utilizados: *M. truncatula* infectada con *B. cinerea* (B y C) y *M. truncatula* infectada y tratada con *B. thuringiensis* UM96 (D y E).

Todo ello nos muestra claramente la capacidad de *B. thuringiensis* UM96 para biocontrolar la infección del hongo *B. cinerea* sobre *M. truncatula*, y nos indica que *B. thuringiensis* UM96 tiene amplias posibilidades para ser usada como biocontroladora de hongos fitopatógenos en campos de cultivo.

DISCUSIÓN

1. Determinación de *Bacillus* sp. UM96 como una especie de *Bacillus thuringiensis*

En este trabajo se determinó que la cepa *Bacillus* sp. UM96 pertenece a la especie *B. thuringiensis*. Se logró amplificar el gen de ADNr 16S (Fig. 4) y se obtuvo su secuencia completa con 1541 pb. El porcentaje de identidad más alto fue de 99% hacia especies del género, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, respectivamente (Tabla 3). La construcción del árbol filogenético con el gen ADNr 16S de algunas especies representativas del género, mostró que la cepa UM96 se encuentra más estrechamente relacionada a una especie de *B. thuringiensis* (Fig. 5). Sin embargo, todos estos elementos no permiten determinar a qué especie pertenece *Bacillus* sp. UM96.

El porcentaje de identidad tan alto que la cepa UM96 mostró a ambas especies (*B. thuringiensis* y *B. cereus*) es común, ya que ambas son parte del grupo de *Bacillus cereus* sensu lato (s.l. que significa en el sentido más amplio), el cual está compuesto por las especies *B. cereus*, *B. thuringiensis*, y *Bacillus anthracis*, principalmente (Helgason et al. 2000; Rasko et al 2005). No obstante también se encuentran dentro del grupo las especies *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides* y *Bacillus weihenstephanensis* (Tourasse et al. 2006; Jensen et al. 2003). Este grupo presenta entre sus integrantes porcentajes de identidad que van de 97 a 100% entre ellos (Ash et al. 1991). El parecido entre estas especies es tal, que estudios filogenéticos con las especies del grupo, en donde se utilizan

|

grupos de genes del metabolismo primario como marcadores moleculares (MLST por sus siglas en inglés: multilocus sequence typing) no encuentran una separación clara entre las especies (Priest et al. 2004; Tourasse & Kolstø 2008; Helgason et al. 2004). Inclusive estudios realizados con otros genes marcadores, no han podido separar de manera clara las especies que integran el grupo de *B. cereus* (Zwick et al. 2012). No obstante, debido a su importancia clínica y agronómica existe una necesidad práctica por distinguir entre ellas; de tal manera que la característica que distingue a *B. thuringiensis* del grupo *Bacillus cereus* sensu lato es su capacidad de ser patógena de insectos (Reiter et al. 2011; Shu et al. 2013). Es posible caracterizar esta capacidad mediante la observación del cuerpo paraesporal (Gao et al. 2008; Ibarra et al. 2003). De tal manera de que al tener indicios sobre la posibilidad de que *Bacillus* sp. UM96 podría pertenecer a la especie de *B. thuringiensis*, se prosiguió a observar por microscopía óptica un putativo cuerpo paraesporal en la cepa. En las fotografías representativas de la Figura 6 es posible observar endosporas, células vegetativas y cuerpos paraesporales, de tal manera que podemos identificar a *Bacillus* sp. UM96 como una especie de *B. thuringiensis*. Los cuerpos paraesporales de *B. thuringiensis* UM96 presentaron una forma esférica pequeña. Las morfologías del cuerpo paraesporal son muy diversas, y existen pocos estudios dedicados a la clasificación y diversidad de dichas morfologías. Sin embargo, se sabe que no existe una relación clara entre el tipo de morfología y la actividad de las proteínas Cry, esto es, a que taxa de insecto tendrán capacidad de ser patógenas

|

(Rampersad & Ammons 2005). De tal manera que no es posible determinar por el tipo de morfología del cuerpo paraesporal, el taxa de insecto al que las proteínas Cry serán patógenas. Es por ello que cuando se desea saber a qué tipo de insecto puede ser patógena una determinada cepa de *B. thuringiensis*, una de las metodologías más utilizadas es la amplificación por PCR de los genes *cry* que codifican la proteína en cuestión (Bravo et al. 1998; Porcar & Juarez-Pérez 2003; Beron et al. 2005; Abulreesh et al. 2012; Shu et al. 2013). De tal manera que se prosiguió a analizar por PCR los genes *cry* presentes en el genoma de la cepa UM96. Es importante mencionar que los genes *cry* son específicos para la especie de *B. thuringiensis* (Ibrahim et al. 2010; Crickmore et al. 1998). Tanto con el objetivo de reafirmar la capacidad de *B. thuringiensis* UM96 de sintetizar un cuerpo paraesporal, como, para tener indicios de a qué orden de insecto podría ser patógena. En nuestro trabajo decidimos enfocarnos en el grupo *cry1A*, porque son un grupo de genes comunes a todas las cepas de *B. thuringiensis* (Heckel et al. 2007; Rampersad & Ammons 2005) y porque, además es el grupo con mayor interés agronómico (Federici 2005; Bravo et al. 2005). En la Figura 7 se observa el producto de PCR con los oligos universales Lep2A y Lep2B (Carozzi et al. 1991), con los que se obtuvo una banda de aproximadamente el peso esperado de 980 pb (Fig. 7). Con esto, podemos sugerir que *B. thuringiensis* UM96 presenta genes *cry* que pertenecen al grupo *cry1A*. De tal manera que también es posible sugerir que *B. thuringiensis* UM96 podría ser hospedera de insectos del orden Lepidoptera ya que como se mencionó anteriormente el grupo *cry1A* se encuentra

|

estrechamente relacionado con la capacidad de *B. thuringiensis* de ser patógena del orden Lepidoptera (Heckel et al. 2007; Uribe et al. 2003). El hecho de que, en este primer PCR tengamos una banda que nos sugiere un gen del grupo *cry1A* resulta ser muy positivo en este trabajo, aún con la inespecificidad que presentaron los oligos Lep2A y Lep2B en *B. thuringiensis* UM96 (Fig. 7), que podría ser explicada debido a la alta diversidad de genes *cry* (Schnepf et al. 1998), además varios trabajos muestran amplificaciones inespecíficas de este tipo (Sauka et al. 2007; Nazarian et al. 2009; Beron et al. 2005).

2. Mecanismo de inhibición de hongos fitopatógenos en *B. thuringiensis* UM96

2.1. *B. thuringiensis* UM96 contiene un gen *chi* de endoquitinasas

De manera general las endoquitinasas tanto de *B. thuringiensis* como de otros organismos se han relacionado en mayor medida con actividad antifúngica (Casique-Arroyo et al. 2007; Reyes-Ramírez et al. 2006; Gomes et al. 2001; Deng et al. 2007), por lo tanto, es de gran importancia para este trabajo el haber amplificado un gen *chi* que codifica para endoquitinasas en *B. thuringiensis* UM96 (Fig. 8). Las endoquitinasas no necesitan un extremo libre en una cadena de quitina para su degradación, de tal manera que podrían estar más involucradas la actividad antifúngica en comparación a las exoquitinasas (Neeraja et al. 2010). Sin embargo también se ha encontrado actividad antifúngica en exoquitinasas (Bolar et al. 2001), inclusive en especies *B. thuringiensis* (Morales de la Vega et al.

|

2006), por lo que no se debe descartar la presencia de esta enzima y su actividad antifúngica en *B. thuringiensis* UM96 e inclusive la posibilidad de un efecto sinérgico de ambas enzimas. Es importante resaltar que se obtuvo una única banda del tamaño esperado (Fig. 8) y que los oligos diseñados para este PCR se hicieron de manera específica, con secuencias que amplifican todo el gen de *B. thuringiensis* (ver materiales y métodos). Además el gen *chi* es un gen altamente conservado dentro de las especies de *B. thuringiensis* (Barboza-Corona et al. 2008, Lin & Xiong 2004, Casique-Arroyo et al. 2007) con porcentajes de identidad que van del 94 al 99% entre ellas (Rosas-García et al. 2013). Todo ello son elementos que nos dan la oportunidad de reafirmar la presencia del gen *chi* de endoquitinasas en el genoma de *B. thuringiensis* UM96. Además, debido a que estos oligos se diseñaron para obtener el ORF (Marco de lectura abierto por sus siglas en inglés Open Reading Frame) completo del gen de endoquitinasas, es posible que este producto de PCR pueda ser utilizado para futuros análisis de expresión heteróloga del gen, lo que nos permitiría analizar a mayor profundidad la actividad de esta proteína.

2.2. *B. thuringiensis* UM96 presentó actividad de quitinasas

Al buscar la actividad de enzimas líticas (glucanasas celulasas y quitinasas) *B. thuringiensis* UM96 mostró únicamente actividad de quitinasas, que aumentó en más del doble al crecer a la cepa UM96 en un medio con quitina como única fuente de carbono (MQ) (Fig. 9). La actividad enzimática encontrada es parecida a

|

otros reportes de quitinasas de *B. thuringiensis* (Morales de la Vega et al. 2006; Reyes-Ramírez et al. 2006; Rosas-García et al. 2013) y el incremento en la actividad de quitinasas al crecer a la bacteria en medio con quitina ha sido también ampliamente reportado (Gomaa 2012; Barboza-Corona et al. 1999), lo que le da una concordancia y fiabilidad a nuestros resultados. Al encontrar actividad de quitinasa y haber logrado la amplificación del gen *chi* de endoquitinasas (Fig. 8), podemos proponer por obviedad la síntesis de quitinasas por *B. thuringiensis* UM96, la cual probablemente podría ser una endoquitinasa.

2.3. La actividad de quitinasa de *B. thuringiensis* UM96 podría estar involucrada en su actividad de inhibición de hongos fitopatógenos

Para averiguar si la actividad de quitinasas de los sobrenadantes CN y MQ se encuentra involucrada en la actividad antifúngica de *B. thuringiensis* UM96, se comparó a los sobrenadantes con quitinasa pura. Además se analizó si la incubación de los sobrenadantes a altas temperaturas tiene un efecto similar al que existe en la actividad de la quitinasa en estas mismas temperaturas. Al encontrar que ambos sobrenadantes tienen actividad antifúngica similar a la quitinasa pura y que inclusive el sobrenadante MQ tiene una tendencia a disminuir más el crecimiento del hongo en comparación al sobrenadante CN (Fig. 10). Sugiere que la actividad de quitinasa de *B. thuringiensis* UM96 podría jugar un papel importante sobre su capacidad antifúngica.

Como se mencionó en los antecedentes, las quitinasas de *B. thuringiensis* son

|

proteínas estables a altas temperaturas ya que su actividad óptima se encuentra entre los 50 y 55 °C y existe una pérdida en la actividad a partir los 60 °C. (Thamthiankul et al. 2001; Barboza-Corona et al. 2003; Barboza-Corona 2008; Rosas-García et al. 2013). Por tanto, el hecho de que ambos sobrenadantes mostraron actividad antifúngica a los 50 °C (Fig. 10), podría ser indicativo de actividad de quitinasa como probable responsable en la disminución del crecimiento del micelio. Además, el sobrenadante MQ incubado a 50 °C mostró mayor disminución estadísticamente significativa en el crecimiento del hongo en comparación con el sobrenadante CN a 50 °C (Fig. 10). Esto podría deberse a que el sobrenadante MQ presenta mayor actividad de quitinasa que el sobrenadante CN (Fig. 9), lo que también nos apoya para sugerir que la actividad de quitinasa de la cepa UM96 está involucrada en la capacidad de inhibición de hongos fitopatógenos. Es importante mencionar que el método que se utilizó presenta la bondad de ser práctico, y aunque no se contó con un extracto puro, nos dio elementos que nos ayudaron a relacionar la actividad de quitinasas con la actividad antifúngica de *B. thuringiensis* UM96.

Las quitinasas también se relacionan con la nutrición de la bacteria al permitir la obtención de carbono en el suelo por la degradación de materia muerta que contiene en su estructura quitina (Thamthiankul et al. 2001). Por lo que es de gran importancia profundizar el estudio de la función ecológica que tienen las quitinasas de *B. thuringiensis*.

En nuestro conocimiento, sólo existen 3 reportes en donde se observa que las

|

quitinasas de *B. thuringiensis* tienen actividad antifúngica (Morales de la Vega et al. 2006; Reyes-Ramírez et al. 2006; Gomaa 2012), por lo que este trabajo adquiere importancia al dar más elementos que identifiquen a las quitinasas de *B. thuringiensis* como enzimas con capacidad antifúngica, así como en la capacidad *B. thuringiensis* de inhibir el crecimiento de fitopatógenos.

Por otro lado, también es importante mencionar que existen reportes donde se involucra la síntesis de quitinasas como un mecanismo que mejora el proceso de patogenicidad a insectos, ya que las quitinasas podrían degradar la pared celular del insecto (Regev et al. 1996; Sampson & Gooday 1998).

Al momento de escribir esta tesis, existían experimentos en proceso para determinar de forma definitiva si el mecanismo inhibitorio es a través de quitinasas, mediante el empleo de un inhibidor específico de estas proteínas como lo es alomicidina en sobrenadantes tratados, se espera que ocurra pérdida de la actividad fungitóxica (Sampson & Gooday 1998; Sakuda et al. 1987), lo que confirmaría que la quitinasa es responsable de la actividad antifúngica de *B. thuringiensis* UM96.

3. Interacciones de *B. thuringiensis* UM96 en la rizósfera

3.1. *B. thuringiensis* UM96 coloniza la rizósfera de maíz

B. thuringiensis UM96 se inoculó en semillas de maíz, con la finalidad de observar su capacidad de colonizar la rizósfera de estas plantas. Se inició con un inóculo de menos de 10^5 CFU en cada semilla. Pasadas 4 semanas se recuperó un número

|

alto de CFU tanto en las plantas crecidas en suelo estéril como en suelo sin ningún tratamiento con un número de CFU alto de aproximadamente 1×10^7 CFU en ambos tratamientos (Fig. 12). Debido a que se encontró un número alto de CFU en ambas condiciones, concluimos que *B. thuringiensis* UM96 tiene capacidad para colonizar la rizósfera del maíz.

Es importante mencionar que existen autores que colocan a *B. thuringiensis* únicamente como una especie patógena de insectos, argumentando que el aislamiento de esta especie en la rizósfera se debe a la recuperación de endosporas y no refleja actividad metabólica en la rizósfera (Jensen et al 2003; Schnepf et al. 1998; Rasko et al. 2005). En este sentido al encontrar un número alto de CFUs en la rizósfera de las plantas de maíz, que sobrepasa el número de CFUs inoculado por semilla (Fig. 12), nos sugiere que *B. thuringiensis* UM96 mantuvo actividad metabólica en la rizósfera de la planta del maíz. Más aún, debido a la escases de nutriente en la arena donde se aisló el inóculo, es posible proponer que la presencia de *B. thuringiensis* UM96 en esta zona se debe a su interacción con la rizósfera del maíz. Además existen varios trabajos que apoyan la colonización de la rizósfera de las plantas en *B. thuringiensis* (Vidal-Quist et al. 2013; Monnerat et al. 2009) e inclusive sobre su capacidad de la colonización en el filoplano de las plantas (Bizzarri & Bishop 2008).

|

3.2. *B. thuringiensis* UM96 disminuye la infección causada por el hongo *B. cinerea* en la planta *M. truncatula*

Las plantas infectadas e inoculadas con *B. thuringiensis* UM96 tuvieron pesos de la parte aérea estadísticamente iguales a las plantas control sin infectar y sin ningún tratamiento (Fig. 13 panel A). *B. thuringiensis* UM96 disminuyó significativamente el porcentaje de hojas infectadas (PLI) y el porcentaje de moho gris sobre la raíz (PR) con respecto a las plantas infectadas sin ningún tratamiento (Fig. 14 panel A). Por lo que *B. thuringiensis* UM96 logró biocontrolar la infección causada por *B. cinerea* en las plantas de *M. truncatula*.

En este trabajo, hasta donde tenemos conocimiento, es la primera vez que se prueba la capacidad de *B. thuringiensis* de biocontrolar el hongo *B. cinerea* en plantas de *M. truncatula*. Choi et al. (2007) reportan 12 cepas de *B. thuringiensis* con capacidades de biocontrolar el hongo de la cenicilla en plantas de pepino y cebada. De manera más reciente Hyakumachi et al. (2013) encuentran que *B. thuringiensis* también tiene actividad en contra del hongo *R. solanacearum* en plantas de tomate. La capacidad de biocontrol de estas cepas es similar a la presente en *B. thuringiensis* UM96, esto nos permite sustentar a *B. thuringiensis* UM96 como una cepa con posibilidades para ser usada como biocontroladora de hongos fitopatógenos.

Los trabajos de biocontrol con cepas de *B. thuringiensis* no son abundantes, a diferencia de la amplia realización de los ensayos *in vitro* hongo-bacteria, sumando varias especies de hongos fitopatógenos a las que *B. thuringiensis* ha

|

logrado inhibir (Zhou et al. 2008; Manns et al. 2012; Kim et al. 2004). Esto es indicativo de las posibilidades de *B. thuringiensis* para ser utilizada como biocontroladora. Por lo que es importante reafirmar esta capacidad en ensayos de biocontrol en condiciones de invernadero y campos de cultivo.

Debido a que *B. thuringiensis* UM96 presentó actividad de quitinasas, la cual podría estar involucrada en su capacidad de inhibir hongos fitopatógenos (Fig. 10), es posible, que las quitinasas puedan también estar involucradas en su capacidad de biocontrol. Como se mencionó anteriormente existen algunos trabajos en donde se ha involucrado la capacidad de *B. thuringiensis* de inhibir hongos fitopatógenos (Morales de la Vega et al. 2006; Reyes-Ramírez et al. 2006; Gomaa 2012). Sin embargo esto no se ha realizado en interacción con la planta en un modelo de biocontrol, por lo que es de gran interés realizar posteriores análisis con inhibidores específicos de quitinasas como la alomicidina (Sakuda et al., 1987) con este modelo de biocontrol.

Vale la pena considerar que *B. cinerea* es de manera general un hongo patógeno de la parte aérea de las plantas, aunque, en ensayos *in vitro* se reporta la infección en la raíz (Harrison 1988) y en condiciones naturales también ha sido aislado de raíces tuberculosas como papa y zanahoria (Droby & Lichter 2004; Williamson et al. 2007). Esto nos sugiere que la disminución en el peso de la raíz de las plantas infectadas y tratadas con *B. thuringiensis* UM96 (Fig. 13 panel B), no es un parámetro significativo en la capacidad de *B. thuringiensis* UM96 para biocontrolar a *B. cinerea*. Recordando que *B. thuringiensis* UM96 mostró

|

disminución de la infección en los demás parámetros utilizados. Además la inoculación de *B. thuringiensis* UM96 en las plantas de *M. truncatula* presentó resultados muy similares a el trabajo realizado por Rojas-Solis (Tesis de Licenciatura. 2012. UMSNH), en donde la cepa UM96, al ser también inoculada en plantas de *M. truncatula*, muestra una tendencia a aumentar la biomasa total.

Todo ello nos permite sugerir a *B. thuringiensis* UM96 como una cepa con amplias posibilidades para ser utilizada como biocontroladora de hongos fitopatógenos y que es posible que las quitinasas se encuentren involucradas en la capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96.

|

RESUMEN DE RESULTADOS

La cepa UM96 pertenece a la especie *Bacillus thuringiensis*.

Los sobrenadantes de *B. thuringiensis* UM96 mostraron actividad de quitinasa y una fuerte actividad antifúngica, similar a la actividad de quitinasa pura.

El sobrenadante tratado a 60 y 70⁰C no mostró actividad antifúngica.

B. thuringiensis UM96 muestra capacidad de colonización en la rizósfera de plantas de maíz.

B. thuringiensis UM96 protege a *M. truncatula* de la infección causada por el hongo fitopatógeno *B. cinerea*.

|

CONCLUSIÓN

La actividad de quitinasa de la cepa *B. thuringiensis* UM96 podría estar involucrada en su capacidad de biocontrol de hongos fitopatógenos.

|

PERSPECTIVAS

Emplear un inhibidor específico de quitinasas, como alomicidina, para determinar su papel específico en el biocontrol de *B. cinerea*.

Determinar en condiciones de invernadero y campo de cultivo la capacidad de biocontrol de *B. thuringiensis* UM96 de hongos fitopatógenos.

Analizar la capacidad de *B. thuringiensis* UM96 como patógena de insectos-plaga en cultivos agrícolas.

Determinar el tipo de genes *cry* que codifican el cuerpo paraesporal de *B. thuringiensis* UM96.

Determinar el nivel de actividad de las quitinasas de *B. thuringiensis* UM96 en su interacción con hongos fitopatógenos.

Analizar el nivel de expresión del gen *chi* de endoquitinasas de *B. thuringiensis* UM96 en la inoculación de hongos fitopatógenos

|

BIBLIOGRAFÍA

Abraham A., Narayanan S. P., Philip S., Nair D. G., Chandrasekharan A. & Kochupurackal J. (2013). In silico characterization of a novel β -1,3-glucanase gene from *Bacillus amyloliquefaciens*—a bacterial endophyte of *Hevea brasiliensis* antagonistic to *Phytophthora meadii*. *J. Mol. Model.* 19: 999–1007.

Abulreesh H. H., Osman G. E. H & Assaeedi A. S. A. (2012). Characterization of insecticidal genes of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from arid environments. *Indian J. Microbiol.* 52:500–503.

Akhtar M. W., Sengupt D. & Chowdhury A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture: their benefits and hazards. *Interdisc. Toxicol.* 2 (1):1-12.

Arora N., Ahmad T., Rojagopal R. & Bhatnagar R.K. (2003). A constitutively expressed 36 kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 307: 620–625.

Ash C., Farrow J. A., Dorsch M., Stackebrandt E. & Collins M. D. (1991). Comparative analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and related species on the basis of reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 41:343–346.

|

Audenaert K., Pattery T., Cornelis P. & Höfte M. (2002). Induction of systemic resistance to *Botrytis cinerea* in tomato by *Pseudomonas aeruginosa* 7NSK2: role of salicylic acid, pyochelin, and pyocyanin. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 1147–1156

Barazani O. & Friedman J. (1999). Is IAA the major root growth factor secreted from plant-growth-mediating bacteria? *J. Chem. Ecol.* 25 (10):2397–2406.

Barboza-Corona J. E., Contreras J. C., Velázquez-Robledo R., Bautista-Justo M., Gómez-Ramírez M., Cruz-Camarillo R., & Ibarra J.E. (1999). Selection of chitinolytic strains of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnol. Lett.* 12: 1125–1129.

Barboza-Corona J. E., Nieto-Mazzoco E., Velázquez-Robledo R., Salcedo-Hernández R., Bautista M. & Ibarra J. E. (2003). Cloning, sequencing, and expression of the chitinase gene *chiA74* from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1023–1029.

Barboza-Corona J. E., Reyes-Rios DM, Salcedo-Hernández R., & Bideshi D. K. (2008). Molecular and biochemical characterization of an endochitinase (ChiA-HD73) from *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73. *Mol. Biotechnol.* 39: 29–37.

|

Baum J. A. & Malvar T. (1995). Regulation of insecticidal crystal protein production in *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 18 (1): 1-12.

Beever, R.E. and Weeds, P.L. (2004) Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), pp. 29 – 52. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

Beron C. M., Curatti L. & Salerno G. L. (2005). New strategy for identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71 (2): 761–765.

Bhattacharyya P. N. & Jha D. K. (2012). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): emergence in agriculture. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28: 1327-1350.

Bibi F., Song G. C. & Chung Y. R. (2012). Research articles: diversity and characterization of endophytic bacteria associated with tidal flat plants and their antagonistic effects on Oomycetous plant pathogens. *Plant Pathol. J.* 28 (1): 20-31.

Bizzarri M. F. & Bishop A. H. (2008). The ecology of *Bacillus thuringiensis* on the

|

phylloplane: colonization from soil, plasmid transfer, and interaction with larvae of *Pieris brassicae*. *Microb. Ecol.* 56: 133–139.

de Boer W., Gunnewiek P., Kowalchuk G. A. & van Veen J. A. (2001). Growth of chitinolytic dune soil β -subclass proteobacteria in response to invading fungal hyphae. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3358–3362.

Bolar J. P., Norelli J. L., Harman G. E., Brown S. K. & Aldwinckle H. S. (2001). Synergistic activity of endochitinase and exochitinase from *Trichoderma atroviride* (*T. harzianum*) against the pathogenic fungus (*Venturia inaequalis*) in transgenic apple plants. *Transgenic Res.* 10:533-543.

Bonkowski M, Cheng W, Griffiths B.S., Alpehi J. & Scheu S. (2000). Microbial-faunal interactions in the rhizosphere and effects on plant growth. *Eur. J. Soil. Biol.* 36: 135-147.

Bravo A., Likitvivatanavong S., Gill S. & Soberón M. (2011). *Bacillus thuringiensis*: A story of a successful bioinsecticide. *Insect. Biochem. Mol. Biol.* 41(7), 423-431.

Bravo A., Sarabia S., Lopez L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Ortiz M., Lina L.,

|

Villalobos F. J., Peña G., Nuñez-Valdez M.-E., Soberón M. & Quintero R. (1998). Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64(12):4965.

Carlson C. R., Caugant D. A. & Kolstø A.-B. (1994). Genotypic diversity among *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1719–1725.

Carozzi N. B, Kramer V. C., Warren G. W., Evola S. & Koziel M. G. (1991). Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by Polymerase Chain Reaction Product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (11): 3057-3061.

Casique-Arroyo G., Bideshi D., Salcedo-Hernández R. & Barboza-Corona, J. E. (2007). Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 92: 1–9.

Cheng Y. M., Hong T. Y., Liu C. C. & Meng M. (2009). Cloning and functional characterization of a complex endo- β -1, 3-glucanase from *Paenibacillus* sp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81 (6): 1051-1061.

Choi G. J., Kim J., Jang K.S., Lee D. (2007). Antifungal activities of *Bacillus thuringiensis*

|

isolates on barley and cucumber powdery mildews. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17 (12): 2071–2075.

Choi J., Choi D., Lee S., Ryu C. M. & Hwang I. (2011). Cytokinins and plant immunity: old foes or new friends? *Trends Plant Sci.* 16: 388–394.

Coughlan M. P. (1991). Mechanisms of cellulose degradation by fungi and bacteria. *Anim. Feed Sci. Technol.* 32: 77-100.

Crickmore N. (2006). Beyond the spore—past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide. *J. Appl. Microbiol.* 101: 616–619.

Crickmore N., Zeigler D. R., Feitelson J., Schnepf E., Van Rie J. Lereclus D., Baum J. & Dean D. H. (1998). Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (3): 807-813.

Daffonchio D., Cherif A., & Borin S. (2000). Homoduplex and heteroduplex polymorphisms of the amplified ribosomal 16S-23S internal transcribed spacers describe genetic relationships in the ‘*Bacillus cereus* group’. *Appl Environ Microbiol* 66: 5460–5468.

|

Davies G. & Henrissat B. (1995). Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases. *Structure*. 3 (9): 853-859.

Dean R., van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Pietro A., Spanu P. D., Rudd, J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J. & Foster G. D. (2012) The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13: 414-430.

Deng S., Lorito M. Penttilä M. & Harman G. E. (2007). Overexpression of an endochitinase gene (ThEn-42) in *Trichoderma atroviride* for increased production of antifungal enzymes and enhanced antagonist action against pathogenic fungi. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 142:81-94.

Driss F., Kallassy_Awad M., Zouari N. & Jaoua S. (2005). Molecular characterization of a novel chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. *J. Appl. Microbiol.* 99: 945-53.

Drobniewski F. A. (1993). *Bacillus cereus* and related species. *Clin. Microbiol. Rev.* 6 (4): 324-338.

Droby, A. & Lichter, A. (2004). Post-harvest *Botrytis* infection: etiology, development and

|

management. In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. (Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P. and Delen, N., eds), pp. 349–367. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Press.

Ellwood S., Kamphuis L. G., Pfaff T., Oliver R. P., Samac D. A., Foster-Hartnett D., Tivoli B., Onfroy C. & Moussart A. (2006). Inoculation and growth with foliar pathogenic fungi. In: *The Medicago truncatula*. Handbook (Mathesius, U., Journet, E.P. and Sumner, L.W., eds), pp. 1–14. Ardmore, PA: The Samuel Roberts Noble Foundation.

Emmert E. A., Klimowicz A. K., Thomas M. G. & Handelsman J. (2004) Genetics of zwittermicin a production by *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 104–113.

Federici B. A. (2005). Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *J. Invertebr. Pathol*, 89(1), 30-38.

Fredslund J., Schauser L., Madsen L. H., Sandal N. & Stougaard J. (2005). PriFi: using a multiple alignment of related sequences to find primers for amplification of homologs. *Nucleic Acids Res.* 33: W516-W520.

Gaiser O. J., Piotukh K., Ponnuswamy M. N., Planas A., Borriss R. & Heinemann U.

|

(2006). Structural basis for the substrate specificity of a *Bacillus* 1,3–1,4-B-glucanase. *J. Mol. Biol.* 357: 1211–1225.

Gao M., Li R., Dai S., Wu Y. & Yi D. (2008). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biol. Control.* 44: 380-388.

Ghasemi S., Ahmadian G., Jelodar N. B., Rahimian H., Ghandili S., Dehestani A., Shariati P. (2010). Antifungal chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: preliminary report. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26:1437–1443.

Ghose T. K. (1987). Measurement of cellulase activities. *Pure. Appl. Chem.* 59: 257–268.

Glick B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica.* 2012: 1-15.

Gomaa E. Z. (2012). Chitinase production by *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus licheniformis*: their potential in antifungal biocontrol. *J. Microbiol.* 50: 103–111.

Gomes R. C., Semedo L. T. A. S., Soares R. M. A., Alviano C. S., Linhares L. F. & Coelho

|

R. R. R. (2000). Chitinolytic activity of actinomycetes from a cerrado soil and their potential in biocontrol. *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 146–150.

Gomes R. C., Semedo L. T. A. S., Soares R. M. A., Linhares L. F., Ulhoa C. J., Alviano C. S., & Coelho R. R. R. (2001). Purification of a thermostable endochitinase from *Streptomyces* RC1071 isolated from a cerrado soil and its antagonism against phytopathogenic fungi. *J. Appl. Microbiol.* 90: 653-661.

Grayston S. J., Wang S., Campbell C. D. & Edwards A. C. (1998). Selective influence of plant species on microbial diversity in the rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 30 (3): 369-378.

Guan P., Ai P., Dai X., Zhang J., Xu L., Zhu J., Li Q., Deng Q., Li S., Wang S., Liu H., Wang L., Li P. & Zheng A. (2012). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* serovar *sichuansis* strain MC28. *J. Bacteriol.* 194 (24): 6975.

Gutiérrez-Luna F. M., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Valencia-Cantero E., Reyes de la Cruz H. & Macías-Rodríguez L. (2010). Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis.* 51: 75-83.

|

Haas D. & Défago, G. (2005). Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nat. Rev. Microbiol.* 3(4), 307-319.

Hameeda B., Harini G., Rupela O. P., Wani S. P. & Reddy G. (2008) Growth promotion of maize by phosphate-solubilizing bacteria isolated from composts and macrofauna. *Microbiol. Res.* 163: 234–242.

Hammami I., Siala R., Jridi M., Ktari N., Nasri M. & Mohamedali T. (2013). Partial purification and characterization of chIO8, a novel antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* IO8. *J. Appl. Microbiol.* 115:358–366.

Hansen B. M., Leser T. D. & Hendriksen N.B. (2001) Polymerase chain reaction assay for the detection of *Bacillus cereus* group cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 202: 209–213.

Haran S., Schickler H. & Chet I. (1996). Molecular mechanisms of lytic enzymes involved in the biocontrol activity of *Trichoderma harzianum*. *Microbiol.* 142 (9): 2321-2331.

Harrison J. G. (1988). The biology of *Botrytis* spp. on *Vicia* beans and chocolate spot disease-a review. *Plant Pathol.* 37: 168-201.

|

Hathout Y., Ho Y.P., Ryzhov V., Demirev P. & Fenselav C. (2002). Kunstakins: a new class of lipopeptides isolated from *Bacillus thuringiensis*. *J. Nat. Prod.* 63: 1492–1496.

He J., Shao X., Zheng H., Li M., Wang J., Zhang Q., Li L., Liu Z., Sun M., Wang S. & Yu Z. (2010). Complete genome sequence of *Bacillus thuringiensis* mutant strain BMB171. *J. Bacteriol.* 192: 4074–4075.

Heckel D. G., Gahan L. J., Baxter S. W., Zhao J. Z., Shelton A. M., Gould F. & Tabashnik B. E (2007). The diversity of Bt resistance genes in species of Lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 95 (3): 192-197.

Helgason E., Økstad O. A., Caugant D. A., Johansen H. A., Fouet A., Mock M., Hegna I. & Kolstø A. B. (2000) *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* – One species on the basis of genetic evidence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 2627–2630.

Helgason E., Tourasse N. J., Meisal R., Caugant D. A. & Kolstø A. B. (2004) Multilocus sequence typing scheme for bacteria of the *Bacillus cereus* group. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 191–201.

|

Hirsch P. R. & Mauchline T. H. (2012). Who's who in the plant root microbiome? *Nat. Biotechnol.* 30 961–962.

Hoster F., Schmitz J. E. & Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 434–442.

Hyakumachi M., Nishimura M., Arakawa T., Asano S., Yoshida S., Tsushima S. & Takahashi H. (2013). *Bacillus thuringiensis* suppresses bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* with systemic induction of defense-related gene expression in tomato. *Microbes. Environ.* 28 (1): 128–134.

Ibarra J. E., Del Rincón M. C., Orduz S., Noriega D., Benintende G., Monnerat R., Regis L., de Oliveira C.M., Lanz H., Rodríguez M. H., Sánchez J., Peña G. & Bravo A. (2003). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5269–5274.

Ibrahim M. A., Griko N., Junker M., & Bulla L. A. (2010). *Bacillus thuringiensis*: a genomics and proteomics perspective. *Bioeng. Bugs.* 1 (1): 31-50.

|

Jensen G. B., Hansen B. M., Ellenberg J. & Mahillon J. (2003). The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environ. Microbiol.* 5: 631–640.

Jewell SN, Waldo RH, Cain CC & Falkinham JO. (2002). Rapid detection of lytic antimicrobial activity against yeast and filamentous fungi. *Journal of Microbiol. Methods* 49: 1–9.

Joo G. J. (2005). Purification and characterization of an extracellular chitinase from the antifungal biocontrol agent *Streptomyces halstedii*. *Biotechnol. Lett.* 27: 1483–1486.

Joo G. J., Kin Y. M., Kim J. T., Rhee I. K., Kim J. H. & Lee I. J. (2005). Gibberellins-producing rhizobacteria increase endogenous gibberellins content and promote growth of red peppers. *J. Microbiol.* 43(6):510–515.

Kamil Z., Rizk M., Saleh M. & Moustafa S. (2007). Isolation and identification of rhizosphere soil chitinolytic bacteria and their potential in antifungal biocontrol. *Global J. Mol. Sci.* 2 (2): 57-66.

Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., & Lugtenberg B. (2005). Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol

|

bacteria. *Environ. Microbiol.* 7:1809–17.

Kim P. I. & Chung K. C. (2004). Production of an antifungal protein for control of *Colletotrichum lagenarium* by *Bacillus amyloliquefaciens* MET0908. *FEMS Microbiol. Lett.* 234: 177–183.

Kim P. I., Bai H., Bai D., Chae H., Chung S., Kim Y., Park R & Chi Y.-T. (2004). Purification and characterization of a lipopeptide produced by *Bacillus thuringiensis* CMB26. *J. Appl. Microbiol.* 97: 942–949.

Kloepper J. W. & Schroth M. N. (1981). Relationship of in vitro antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria to plant growth and the displacement of root microflora. *Phytopathology.* 71: 1020–1024.

Kloepper J. W., Ryu C.-M. & Zhang S. (2004). Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology.* 94: 1259–1266.

Kolstø A.-B. (2000). *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis*—one species on the basis of genetic evidence. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2627–2630.

|

Kulminskaya A. A., Tomsen K. K., Shabalin K. A., Sidorenko I. A., Eneyskaya E. V., Savel'ev A. N. & Neustroev K. N. (2001). Isolation, enzymatic properties, and mode of action of an exo-1,3-b-glucanase from *Trichoderma viride*. *Euro J. Biochem.* 23: 6123–6131.

Kumar A., Prakash A. & Johri B. N. (2011). *Bacillus* as PGPR in crop ecosystem. p 37–59. In Maheshwari DK (ed), *Bacteria in agrobiolgy: crop ecosystems*, 1st ed. Springer, New York, NY.

Laslo É., György É., Mara G., Tamás É., Ábrahám B. & Lányi S. (2012). Screening of plant growth promoting rhizobacteria as potential microbial inoculants. *Crop Protection.* 40: 43-48.

Lee S. Y., Tindwa H., Lee Y. S., Naing K. W., Hong S. H., Nam Y. & Kim K. Y. (2012). Biocontrol of anthracnose in pepper using chitinase, beta-1,3 glucanase, and 2-furancarboxaldehyde produced by *Streptomyces cavourensis* SY224. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2 (10): 1359–1366.

Leveau J. H. & Preston G. M. (2008). Bacterial mycophagy: definition and diagnosis of a unique bacterial–fungal interaction. *New Phytologist.* 177 (4): 859-876.

|

Lim H. S., Kim Y. S. & Kim S. D. (1991). *Pseudomonas stutzeri* YPL-1 genetic transformation and antifungal mechanism against *Fusarium solani*, an agent of plant root rot. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 510–516.

Lima A. O. S, Quecine M. C., Fungaro M. H. P., Andreote F. D., Jr. Maccheroni W., Araújo W. L., Silva-Filho M. C., Pizzirani-Kleiner A. A. & Azevedo J. L. (2005). Molecular characterization of a β -1,4-endoglucanase from an endophytic *Bacillus pumilus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68: 57-65.

Lin L., Kan X., Yan H. & Wang D. (2012). Characterization of extracellular cellulose degrading enzymes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Electron. J. Biotechnol.* 15 (3): 1-7.

Lin Y. & Xiong G. (2004). Molecular cloning and sequence analysis of the chitinase gene from *Bacillus thuringiensis* serovar *alesti*. *Biotechnol. Lett.* 26: 635–639.

Lucy M., Reed E. & Glick B. R. (2004). Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86 (1): 1–25.

de Maagd R. A., Bravo A. & Crickmore N. (2001). How *Bacillus thuringiensis* has evolved

|

specific toxins to colonize the insect world. *TRENDS in Genet.* 17 (4): 193-199.

Manns D. C., Churey J. J. & Worobo R. W. (2012). Functional assignment of YvgO, a novel set of purified and chemically characterized proteinaceous antifungal variants produced by *Bacillus thuringiensis* SF361. *Appl. Environ. Microbiol.* 78 (8): 2543-2552.

Manzano M., Cocolin L., Cantoni C. & Comi G. (2003). *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus mycoides* differentiation using a PCR-RE technique. *Int. J. Food. Microbiol.* 81: 249–254.

Martin D. F., Priest F. G., Todd C. & Goodfellow M. (1980). Distribution of 3-glucanases within the genus *Bacillus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1136-1138.

Martínez-Absalón, S. C., Orozco-Mosqueda Ma. del C., Martínez-Pacheco M. M., Farías-Rodríguez R., Govindappa M. & Santoyo G. (2012). Isolation and molecular characterization of a novel strain of *Bacillus* with antifungal activity from the sorghum rhizosphere. *Genet. Mol. Res.* 11:2665-2673.

Miller G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.* 31: 426–428.

|

Monnerat R. G., Soares C. M., Capdeville G., Jones G., Martins E., Praça L., Arrivabene B., Vasconcelos S., Cavalcante R. & Berry C. (2009). Translocation and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* living inside of plants. *Microb. Biotechnol.* 2: 512–520.

Morales de la Vega L., Barboza-Corona J.E., Aguilar-Uscanga M.G. & Ramírez-Lepe M. (2006). Purification and characterization of an exochitinase from *Bacillus thuringiensis* ssp. *aizawai* and its action against phytopathogenic fungi. *Can. J. Microbiol.* 52: 651–657.

Mulvaney R. L., Khan S. A. & Ellsworth T. R. (2009). Synthetic nitrogen fertilizers deplete soil nitrogen: a global dilemma for sustainable cereal production. *J. Environ. Qual.* 38: 2295–2314.

Nagarajkumar M., Bhaskaran R. & Velazhahan R. (2004). Involvement of secondary metabolites and extracellular lytic enzymes produced by *Pseudomonas fluorescens* in inhibition of *Rhizoctonia solani*, the rice sheath blight pathogen. *Microbiol. Res.* 159: 73–81.

Nair J. R. Narasimman G. & Sekar V. (2004). Cloning and partial characterization of zwittermicin A resistance gene cluster from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* strain HD1. *J. Appl. Microbiol.* 97: 495–503.

|

Nazarian A., Jahangiri R., Jouzani G. S., Seifinejad A., Soheilvand S., Bagheri O., Keshavarzi M. & Alamisaeid K. (2009). Coleopteran-specific and putative novel *cry* genes in Iranian native *Bacillus thuringiensis* collection. *J. Invertebr. Pathol.* 102: 101–109.

Neeraja C., Anil K., Purushotham P., Suma K., Sarma P., Moerschbacher B. M. & Podile A. R. (2010). Biotechnological approaches to develop bacterial chitinases as a bioshield against fungal diseases of plants. *Crit. Rev. Biotechnol.* 30: 231-241.

Nickerson, K. W., & Bulla L. A. (1974). Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: minimal nutritional requirements for growth, sporulation, and parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Microbiol.* 28:124-128.

Nielsen M. N., Sorensen J., Fels J. & Pedersen H. C. (1998). Secondary metabolite- and endochitinase-dependent antagonism toward plant-pathogenic microfungi of *Pseudomonas fluorescens* isolates from sugar beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 3563–3569.

Nielsen P. & Sorensen J. (1997). Multi-target and medium-independent fungal antagonisms by hydrolytic enzymes in *Paenibacillus polymyxa* and *Bacillus pumilus* strains from barley rhizosphere. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22: 183–192.

|

Orozco-Mosqueda Ma. del C., Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L. I., Santoyo G., Flores-Cortez I., Alfaro-Cuevas R. & Valencia-Cantero E. (2013a). *Arthrobacter agilis* UMCV2 induces iron acquisition in *Medicago truncatula* (strategy I plant) in vitro via dimethylhexadecylamine emission. *Plant Soil*. 362: 51–66.

Orozco-Mosqueda Ma. del C., Macías-Rodríguez L., Santoyo G., Farías-Rodríguez R. & Valencia-Cantero E. (2013b). *Medicago truncatula* increases its iron uptake mechanisms in response to volatile organic compounds produced by *Sinorhizobium meliloti*. *Folia Microbiol*. 58: 579-585.

Ortíz-Castro R, Martínez-Trujillo M & López-Bucio J. (2008). N-acyl-L homoserine lactones: a class of bacterial quorum-sensing signals alter post-embryonic root development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*. 31: 1497-509.

Picard K., Tirilly Y., Benhamou N. (2000). Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Pythium oligandrum*. *Appl. Environ. Microbiol*. 66: 4305–4314.

Pitson S. M., Seviour R. J. & McDougall B. M. (1993). Non-cellulolytic fungal B-glucanases : their physiology and regulation. *Enzyme Microb. Techno*. 15: 178-192.

|

Planas A. (2000). Bacterial 1,3-1,4-B-glucanases: structure, function and protein engineering. *Biochim. Biophys. Acta.* 1543: 361–82.

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

Prasanna L., Eijsink V. G. H., Meadow R. & Gaseidnes S. (2013). A novel strain of *Brevibacillus laterosporus* produces chitinases that contribute to its biocontrol potential. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97:1601–1611.

Priest F. G., Barker M., Baillie L. W., Holmes E. C. & Maiden M. C. (2004). Population structure and evolution of the *Bacillus cereus* group. *J. Bacteriol.* 186: 7959–7970.

Raddadi N., Cherif A., Boudabous A. & Daffonchio D. (2008). Screening of plant growth promoting traits of *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Microbiol.* 58: 47–52.

Raddadi N., Belaouis A., Tamagnini I., Hansen B. M., Hendriksen N. B., Boudabous A., Cherif A. & Daffonchio D. (2009). Characterization of polyvalent and safe *Bacillus thuringiensis* strains with potential use for biocontrol. *J Basic Microbiol.* 48: 1–11.

|

Rampersad J., Khan A. & Ammons D. (2002). Usefulness of staining parasporal bodies when screening for *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 79: 203-204.

Rampersad J. & Ammons D. (2005). A *Bacillus thuringiensis* isolation method utilizing a novel stain, low selection and high throughput produced atypical results. *BMC Microbiol.* 5: 52-63.

Rasko D. A., Altherr M. R., Han C. S. & Ravel J. (2005). Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 303–329.

Regev A., Keller M., Strizhov N., Sneh B., Prudovsky E., Chet I., Ginzberg I., Koncz-Kalman Z., Koncz C., Schell J. & Zilberstein A. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 3581–3586.

Reiter, L., Tourasse N. J., Fouet A., Loll R., Davison S., Økstad O. A., Piehler A. P. & Kolstø A.-B. (2011). Evolutionary history and functional characterization of three large genes involved in sporulation in *Bacillus cereus* group bacteria. *J. Bacteriol.*, 193 (19): 5420-5430.

|

Reyes-Ramírez A., Escudero-Abarca B. I., Aguilar-Uscanga G., Hayward-Jones P. M. & Barboza-Corona J. E. (2006). Antifungal activity of *Bacillus thuringiensis* chitinase and its potential for the biocontrol of phytopathogenic fungi in soybean seeds. *J. Food. Sci.* 69: 131–134.

Rojas-Solis D. (2012) Actividades antagónicas y de biocontrol de la cepa *Bacillus* sp. UM96 contra hongos patógenos de plantas. *Tesis de licenciatura sin publicar*. UMSNH. Mich. Mex.

Rosas-García N. M., Fortuna-González J. M. & Barboza-Corona J. E. (2013). Characterization of the chitinase gene in *Bacillus thuringiensis* Mexican isolates. *Folia Microbiol (Praha)*. DOI 10.1007/s12223-013-0233-y.

Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Wei H. X., Paré P. W. & Kloepper J. W. (2003). Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 100: 4927-32.

Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Kloepper J. W. & Paré P. W. (2004). Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 134: 1017-26.

|

Ryu C. M., Hu C. H., Locy R. D. & Kloepper J. W. (2005). Study of mechanisms for plant growth promotion elicited by rhizobacteria in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Soil*. 268: 285–292.

Sakuda S., Isogai A., Matsumoto S. & Suzuki A. (1987). Search for microbial insect growth regulators. 11. Allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 40: 296-300.

Sampson M. N. & Gooday G. W. (1998). Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiol.* 144: 2189–2194.

Santoyo G., Valencia-Cantero E., Orozco-Mosqueda Ma. del C., Peña-Cabriaes J. J. & R. Farias-Rodriguez (2010). Papel de los sideroforos en la actividad antagónica de *Pseudomonas fluorescens* ZUM80 hacia hongos fitopatógenos. *Terra*. 28: 53-60.

Santoyo G., Orozco-Mosqueda Ma. del C. & Govindappa M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*: a review. *Biocontrol. Sci. Technol.* 22:855-872.

Sauka D. H., Amadio A. F., Zandomeni R. O. & Benintende G. B. (2007). Strategy for amplification and sequencing of insecticidal cry1A genes from *Bacillus thuringiensis*.

|

Antonie Van Leeuwenhoek. 91: 423–430.

Scher F. M., Ziegler J. S. & Kloepper J. W. (1984). A method for assessing the root-colonizing capacity of bacteria on maize. *Can. J. Microbiol.* 30: 151-157.

Schnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus D., Baum J., Feitelson J., Zeigler D. R. & Dean D. H. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.

Shao T., Bai L., Zhang J., Wang G., Liu D., Li Z., Liu J., Song F. & Huang D. (2008). A nonribosomal peptide synthetase gene *tzw1* is involved in zwittermicin A biosynthesis in *Bacillus thuringiensis* G03. *Curr. Microbiol.* 57 (1): 61–65.

Shu C. , Liu D., Zhou Z., Cai J., Peng Q., Gao J., Song F. & Zhang J. (2013). An improved PCR-RFLP method for the identification of *cry1*-type genes. *Appl. Environ. Microbiol.* DOI: 10.1128/AEM.01983-13.

Silo-Suh L. A., Lethbridge B. J., Raffel S. J., He H., Clardy J. & Handelsman J. (1994). Biological activities of two fungistatic antibiotics produced by *Bacillus cereus* UW85. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2023–2030.

|

Silo-Suh L. A., Stabb E. V., Raffel S. J. & Handelsman J. (1998). Target range of zwittermicin A, an aminopolyol antibiotic from *Bacillus cereus*. *Curr. Microbiol.* 37: 6–11.

Singh B. & Satyanarayana T. (2011). Microbial phytases in phosphorus acquisition and plant growth promotion. *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 17: 93-103.

Someya N., Nakajima M., Hirayae K., Hibi T. & Akutsu K. (2001). Synergistic antifungal activity of chitinolytic enzymes and prodigiosin produced by the biocontrol bacterium *Serratia marcescens* strain B2 against the gray mold pathogen, *Botrytis cinerea*. *J. Gen. Plant. Pathol.* 67: 312–317.

Stabb E. V., Jacobson L. M. & Handelsman J. (1994) Zwittermicin A-producing strains of *Bacillus cereus* from diverse soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4404–4412.

Statsoft Inc. (2001). STATISTICA (data analysis software system), 6th edn. Tulsa, USA.

Suresh P. V. & Chandrasekaran M. (1998). Utilization of prawn waste for chitinase production by the marine fungus *Beauveria bassiana* by solid state fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 655–660.

|

Swiontek M., Jankiewicz U., Burkowska A & Walczak M. (2013). Chitinolytic microorganisms and their possible application in environmental protection. *Curr. Microbiol.* DOI 10.1007/s00284-013-0440-4.

Takahashi H., Nakaho K., Ishihara T., Ando S., Wada T., Kanayama Y., Asano S., Yoshida S., Tsushima S. & Hyakumachi M. (2013). Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. *Plant. Cell. Rep.* DOI 10.1007/s00299-013-1515-1.

Tenorio-Sánchez S. A., Rojas-Avelizapa N. G., Ibarra J. E., Rojas Avelizapa L. I. & Cruz-Camarillo R. (2010). Characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated from a highly polychlorinated biphenyls contaminated soil. *Tecnología*. 3 (3): 52-63.

Thamthiankul S., Suan-Ngay S. Tantimavanich S. & Panbangred W. (2001). Chitinase from *Bacillus thuringiensis* subsp. *pakistani*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56: 395–401.

Tourasse N. J. & Kolstø A. B. (2008). SuperCAT: A supertree database for combined and integrative multilocus sequence typing analysis of the *Bacillus cereus* group of bacteria (including *B. cereus*, *B. anthracis* and *B. thuringiensis*). *Nucleic. Acids. Res.* 36: D461–D468.

|

Tourasse N. J., Helgason E., Økstad O. A., Hegna I. K. & Kolstø AB. (2006). The *Bacillus cereus* group: Novel aspects of population structure and genome dynamics. *J. Appl. Microbiol.* 101: 579–593.

Uribe D., Martínez W. & Cerón J. (2003). Distribution and diversity of cry genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtained from different ecosystems from Colombia. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 119–127.

Vachon V., Laprade R. & Schwartz J. L. (2012). Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: a critical review. *J. Invertebr. Pathol.* 111: 1–12.

Velázquez-Becerra C, Macías-Rodríguez L. I., López-Bucio J., Flores-Cortez I., Santoyo G., Hernández-Soberano C. & Valencia-Cantero E. (2013). The rhizobacterium *Arthrobacter agilis* produces dimethylhexadecylamine, a compound that inhibits growth of phytopathogenic fungi in vitro. *Protoplasma*. DOI 10.1007/s00709-013-0506-y.

Velázquez-Becerra C., Macías-Rodríguez L. I., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Flores-Cortez I., Valencia-Cantero E. (2011). A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecyl-amine, an amino-containing lipid

|

modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. *Plant Soil*. 339: 329–340.

Vidal-Quist J. C., Rogers H. J., Mahenthiralingam E., & Berry, C. (2013). *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. *FEMS Microbiol. Ecol.* DOI: 10.1111/1574-6941.12175.

Weisburg W. G., Barns S. M., Pelletier D. A., & Lane D. J. (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2): 697–703.

Whipps J. M. (2001). Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J. Exp. Bot.* 52:487–511.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & van Kan, J. A. L. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Mol. Plant Pathol.* 8, 561–580.

Yang J., Kloepper J. W. & Ryu C. M. (2009). Rhizosphere bacteria help plants tolerate abiotic stress. *Trends. Plant Sci.* 14: 1-4.

|

Zhou Y., Choi Y. L., Sun M. & Yu Z. (2008). Novel roles of *Bacillus thuringiensis* to control plant diseases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80 (4): 563-572.

Zwick M. E., Joseph S. J., Didelot X., Chen P. E., Bishop-Lilly K. A., Stewart A. C., Willner K., Nolan N., Lentz S., Thomason M. K., Sozhamannan S., Mateczun A. J., Du L. & Read T. D. (2012). Genomic characterization of the *Bacillus cereus sensu lato* species: Backdrop to the evolution of *Bacillus anthracis*. *Genome Research.* 22:1512–1524.