



Universidad Nacional
SAN LUIS GONZAGA



Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional

Esta licencia permite a otras combinar, retocar, y crear a partir de su obra de forma no comercial, siempre y cuando den crédito y licencia a nuevas creaciones bajo los mismos términos.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**“VARIABILIDAD FILOGENÉTICA DE *Bacillus thuringiensis* AISLADOS DE
Copitarsia incommoda BASADA EN EL ANÁLISIS DEL GEN *gyrB*”**

TESIS
PARA OBTENER TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO

PRESENTADO POR:

Bach. CARBAJAL LÉVANO, Aida Brighith

Bach. VÁSQUEZ CUCHO, Váleri Suzette

ICA – PERÚ

2021

UNIVERSIDAD NACIONAL “SAN LUIS GONZAGA”
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE BIOLOGÍA

**“VARIABILIDAD FILOGENÉTICA DE *Bacillus thuringiensis* AISLADOS DE
Copitarsia incommoda BASADA EN EL ANÁLISIS DEL GEN *gyrB*”**

Área de conocimiento: Ciencias Médicas y de la Salud

Línea de investigación: Salud pública y conservación del medio ambiente

Autores:

***Bach.* CARBAJAL LÉVANO, Aida Brighith**

***Bach.* VÁSQUEZ CUCHO, Valeri Suzette**

Asesores:

Dra. Rosa Bertha Altamirano Díaz

Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez

A todas aquellas personas que
estuvieron a nuestro lado
apoyándonos en el proceso de
realización de este trabajo de
investigación.

AGRADECIMIENTOS

A nuestras familias, por darnos su respaldo y comprensión durante todo este tiempo.

A nuestros asesores de tesis, la Dra. Rosa Altamirano Díaz y al Dr. Juan Carlos Tantaleán Vásquez por sus consejos y aportes para la ejecución del presente trabajo de investigación.

Al laboratorio de análisis BIOSLAB, por permitirnos realizar parte de los procedimientos necesarios para el desarrollo de esta tesis.

A todas las personas que de alguna manera influyeron y colaboraron en la realización de esta tesis.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	01
ABSTRACT.....	02
INTRODUCCIÓN.....	03
I. MARCO TEÓRICO.....	05
1.1. Antecedentes del problema de investigación.....	05
1.1.1. Antecedentes a nivel internacional.....	05
1.1.2. Antecedentes a nivel nacional.....	10
1.1.3. Antecedentes a nivel local.....	10
1.2. Bases teóricas de la investigación.....	10
1.2.1. Variabilidad filogenética de <i>B. thuringiensis</i>	10
1.2.1.1. Variabilidad filogenética.....	10
1.2.1.2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
1.2.2. Gen <i>gyrB</i>	12
1.2.2.1. Genes como marcadores moleculares.....	13
1.3. Marco conceptual.....	13
II. PLANEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.....	18
2.1. Situación problemática.....	18
2.2. Formulación de problemas.....	18
2.2.1. Problema general.....	18
2.2.2. Problemas específicos.....	18
2.3. Delimitación del problema.....	19
2.4. Justificación e importancia de la investigación.....	20
2.4.1. Justificación.....	20
2.4.2. Importancia.....	21
2.5. Objetivos de la investigación.....	22
2.5.1. Objetivo general.....	22
2.5.2. Objetivos específicos.....	22
2.6. Hipótesis de la investigación.....	23
2.6.1. Hipótesis general.....	23
2.6.2. Hipótesis específicas.....	23
2.7. Variables de Investigación.....	24
2.7.1. Identificación de variables.....	24
2.7.2. Operacionalización de variables.....	24
III. ESTRATEGIA METODOLÓGICA / METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN.....	25
3.1. Tipo, nivel y diseño de la investigación.....	25
3.2. Población y muestra materia de investigación.....	25

IV.	TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN.....	26
4.1.	Técnicas de recolección de datos.....	26
4.2.	Instrumentos de recolección de datos.....	26
4.3.	Técnicas de procesamiento de datos, análisis e interpretación de resultados.....	26
4.3.1.	Reactivación de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	26
4.3.2.	Extracción de ADN.....	27
4.3.3.	Amplificación del gen <i>gyrB</i> mediante PCR	29
4.3.4.	Secuenciación de amplificadores de PCR.....	31
4.3.5.	Búsqueda de homólogos en la base de datos “Genbank”	31
4.3.6.	Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas.....	32
4.3.7.	Construcción de árboles filogenéticos.....	33
4.3.7.1.	Selección de un modelo de sustitución nucleotídica.....	33
4.3.7.2.	Reconstrucción filogenética.....	34
4.3.8.	Construcción de la matriz de identidad.....	34
V.	PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	36
5.1.	Presentación e interpretación de resultados.....	36
5.2.	Discusión de resultados.....	41
VI.	COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS.....	48
6.1.	Contrastación de hipótesis general.....	48
6.2.	Contrastación de hipótesis específicas.....	48
	CONCLUSIONES.....	49
	RECOMENDACIONES.....	50
	FUENTES DE INFORMACIÓN.....	51
	ANEXOS.....	60

RESUMEN

Bacillus thuringiensis es una bacteria de importancia agronómica debido a su capacidad de formar cristales proteínicos con propiedades entomopatógenas. A nivel de subespecie se clasifica en más de 84 serovares. El gen *gyrB*, codificador de la enzima ADN girasa, permite la discriminación entre este tipo de bacterias.

El objetivo de este trabajo fue analizar la secuencia nucleotídica del gen *gyrB* de 14 cepas de *B. thuringiensis* aisladas a partir de larvas de *Copitarsia incommoda* pertenecientes al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga mediante secuenciación y alineamiento, para la identificación molecular a nivel de serovar y la determinación de su variabilidad filogenética con el propósito de determinar la biodiversidad de esta especie en la región de Ica a fines de aislar cepas nativas con potencial entomopatógeno que se encuentren mejor adaptadas.

Se identificaron a nivel de serovar 13 de las 14 cepas de estudio, 7 las cepas se identificaron como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, 5 como *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* y 2 como *B. thuringiensis* serovar *galleriae*. No se logró determinar el serovar de la cepa denominada como C-257 debido a que presentaba homología con diversas secuencias en la base de datos. Un árbol filogenético fue generado el cual mostró las relaciones filogenéticas entre las cepas. La similitud entre secuencias nucleotídicas tuvo un valor promedio de 62.2%.

Se ha demostrado que las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* presentan una alta variabilidad entre sus secuencias del gen *gyrB*.

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis is an agronomic importance bacterium due to its ability to form protein crystals with entomopathogenic properties. At subspecies level, it is classified into more than 84 serovars. The *gyrB* gene, which encodes DNA gyrase enzyme, allows discrimination among this type of bacteria.

The aim of this work was to analyze the *gyrB* gene nucleotide sequence of 14 strains of *B. thuringiensis* isolated from *Copitarsia incommoda* larvae that belongs to the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology of the San Luis Gonzaga National University through sequencing and alignment, for the molecular identification at the serovar level and the determination of its phylogenetic variability to determine the biodiversity of this species in the Ica region in order to isolate better adapted native strains with entomopathogenic potential.

13 of the 14 study strains were identified at the serovar level, 7 strains were identified as *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, 5 as *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* and 2 as *B. thuringiensis* serovar *galleriae*. It was not possible to determine the serovar of the strain called C-257 because it presented homology with various sequences in the database. A phylogenetic tree was generated which showed the phylogenetic relationships between the strains. The similarity between nucleotide sequences had an average value of 62.2%.

B. thuringiensis strains isolated from *C. incommoda* have been shown to exhibit high variability between their *gyrB* gene sequences.

INTRODUCCIÓN

Bacillus thuringiensis es una bacteria aerobia Gram positiva que habita una gran variedad de ambientes y tiene la capacidad de formar esporas y cristales proteínicos con propiedades entomopatógenas (1,2).

La discriminación de subespecies entre cepas de *B. thuringiensis* se realiza mediante ensayos de serotificación del antígeno flagelar H (3,4), logrando clasificar a la especie *B. thuringiensis* en más de 84 serovares (5). Este método de uso actual, presenta algunas limitaciones dificultando la identificación de *B. thuringiensis* a nivel de serovar y la determinación de la relación filogenética entre las cepas (6,7).

Técnicas moleculares como la amplificación por PCR de genes específicos (8) tales como: *16SrRNA (rrs)*, *16S-23S ARNr (ITS)*, *ARNr 23S*, *rpoB* y *gyrB*, permiten solventar esas limitaciones (9).

El gen *gyrB*, que codifica la subunidad β de la enzima ADN girasa, una topoisomerasa de ADN de tipo II, presenta una mayor especificidad en comparación con otros genes, principalmente en la discriminación de especies estrechamente relacionadas como ocurre en el grupo *Bacillus cereus* (9,10).

El análisis filogenético y comparación de las secuencias nucleotídicas de los genes marcadores determinan el grado de similitud entre secuencias (11), el cual permite la estimación de las distancias genéticas para la reconstrucción filogenética (12). Esta reconstrucción brinda conocimientos sobre estructura, distribución, variación entre las poblaciones de microorganismos (13) y diversidad o variabilidad filogenética la cual

además de tener un valor taxonómico también contribuye a revelar la estructura genética de las poblaciones (14).

Cepas comerciales son ampliamente utilizadas en el control de insectos patógenos, sin embargo la introducción de especies ajenas al entorno puede presentar dificultades (15). Actualmente para el desarrollo de las actividades agrícolas se emplean una serie de productos químicos que generan un medio altamente selectivo y reducen la variabilidad de especies y subespecies bacterianas (16). La importancia del presente estudio radica en conocer la variabilidad filogenética de los aislados de *B. thuringiensis* y permite tener una visión más amplia sobre la biodiversidad de esta especie en la región, ya que a mayor biodiversidad existe mayor probabilidad de aislar cepas nativas mejor adaptadas para poder explotar sus cualidades entomopatógenas para el control de plagas de importancia económica.

El presente trabajo de investigación brinda conocimientos sobre la biodiversidad de *B. thuringiensis* con potencial entomopatógeno en el valle de Ica; para ello se planteó como objetivos realizar la identificación a nivel de serovar de 14 cepas de *B. thuringiensis*, aisladas a partir de larvas *Copitarsia incommoda*, pertenecientes al Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología – UNSLG. Asimismo, determinar las relaciones filogenéticas existentes entre ellas y el grado de variabilidad de sus secuencias nucleotídicas para tener un panorama sobre su diversidad genético molecular.

CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1.1 Antecedentes del problema de investigación:

1.1.1. Antecedentes a nivel internacional:

Fukushima et al. (2002) en Japón, identificaron especies estrechamente relacionadas de los géneros *Salmonella*, *Shigella* y *E. coli*, las cuales son difíciles de diferenciar por métodos bioquímicos, para contribuir en la adopción de tratamientos mejor dirigidos y por lo tanto más efectivos contra las diversas enfermedades. Emplearon la secuenciación del gen *gyrB*, amplificados mediante PCR. Concluyeron que las especies que presentaban el mismo serotipo, no necesariamente se encontraban dentro de un mismo clúster genético.

Soufiane y Côté (2009) en Canadá, determinaron la capacidad de discriminación de los genes *16SrRNA*, *gyrB* y *aroE* entre serotipos y serovares de *B. thuringiensis*. Secuenciaron los productos de amplificación por PCR de estos genes en 74 cepas y los analizaron con el programa MEGA. Concluyeron que las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* eran suficientemente diferentes para discriminar entre serotipos y serovares de *B. thuringiensis*.

Kirby et al. (2010) en Sudáfrica, emplearon el análisis del gen *gyrB* para demostrar su potencial en estudios filogenéticos del género *Kribbella*.

Amplificaron por PCR regiones parciales del gen *gyrB* de 33 cepas; las secuencias se analizaron con los programas ClustalX y MEGA, mostrando una mejor resolución filogenética en comparación con las secuencias del gen *16SrRNA*. Concluyeron que el gen *gyrB* es una buena opción para distinguir entre cepas de este género o encontrar nuevas especies.

Mulet et al. (2010) en España, analizaron las secuencias parciales de los genes *16SrRNA*, *gyrB*, *rpoB* y *rpoD*, de 107 cepas del género *Pseudomonas* para comprender sus relaciones filogenéticas, manera individual y conjunta. Mediante el análisis de secuencias multilocus obtuvieron valores altos de diversidad nucleotídica de las cepas en relación a los genes *gyrB* y *rpoB*.

Peeters y Willems (2011) en Bélgica, aislaron y clasificaron bacterias del género *Flavobacterium*, provenientes de la Antártida, en base a los genes *gyrB* y *16SrRNA* mediante la técnica REP-PCR con los que obtuvieron árboles filogenéticos con las mismas agrupaciones. Sin embargo, los diferentes porcentajes de similitud indicaron que el gen *gyrB* es mejor que el gen *16SrRNA* para discriminar entre especies. Otro hallazgo importante fue que el gen *16SrRNA* era idéntico o muy similar en especies distintas pero que están estrechamente relacionadas, originando dudas acerca del descubrimiento de nuevas especies. Concluyeron que el gen *gyrB* evoluciona rápidamente por ser de mantenimiento celular y por consiguiente proporciona un menor porcentaje de similitud entre especies nuevas.

Huang et al. (2014) en Taiwán, determinaron las relaciones interespecíficas de cepas del grupo *Acetobacter pasteurianus* mediante el análisis de secuencias parciales del gen *gyrB* de 38 cepas de *Acetobacter*, amplificadas mediante ensayos de PCR. Concluyeron que este gen posee una resolución filogenética más alta que el gen *16SrRNA* además de ser un posible marcador específico para identificación de especies del grupo *Acetobacter*.

Vidal-Quist et al. (2013) en Reino Unido, compararon las filogenias obtenidas con base al método MLST y el gen *gyrB*, manteniendo las mismas agrupaciones en ambos casos. Sin embargo, la importancia del uso del gen *gyrB* no solo radicó en su uso para discriminar entre especies del mismo género, sino también en la confiabilidad y congruencia de las relaciones filogenéticas. Concluyeron que, la capacidad de *B. thuringiensis* para colonizar raíces, dependía de su filogenia y que la existencia de mayor diversidad entre cepas genera rasgos o características que son productos de su evolución a lo largo del tiempo.

Branquinho et al. (2014) en Portugal, revelaron la plasticidad genómica de 28 cepas identificadas previamente como *Bacillus pumilus*, mediante características bioquímicas, fenotípicas y gen *16SrRNA*. Mediante el análisis filogenético de los genes *gyrB* y *rpoB* lograron reasignar a estas cepas como *B. invictae* o *B. safensis*. Por otro lado, demostraron que estas especies poseen gran diversidad lo cual les permite adaptarse a diversos nichos.

Carrasco et al. (2015) en España, identificaron especies estrechamente relacionadas dentro del género *Nocardia* mediante una comparación entre árboles filogenéticos, obtenidos con base a los genes *16SrRNA* y *gyrB*. Concluyeron que la identificación con base al gen *16SrRNA* no era la mejor opción debido a que mostraron un alto grado de similitud, mientras que aquella obtenida con base al gen *gyrB* mostró una alta capacidad discriminativa, logrando una mejor clasificación a nivel de especie del género *Nocardia* y una agrupación de una forma distinta pero más confiable.

Galloway-Peña et al. (2014) en Estados Unidos, usaron los genes *gyrB*, *16SrRNA* y *sodA*, mediante un análisis MLSA, para identificar de forma más económica y eficaz a las especies del grupo *Streptococcus viridans*. Determinaron que el gen *gyrB* discriminaba eficientemente especies de dicho grupo, proporcionando agrupamientos congruentes y confiables. Por otro lado, especies en particular como *Streptococcus mitis* y *Streptococcus oralis*, que son difíciles de diferenciar, mostraron diferencias en ciertos codones de la secuencia del gen *gyrB*, lo que hizo que dichas especies sean agrupadas con mayor facilidad.

Savi et al. (2016) en Brasil, emplearon el gen *gyrB*, como parte de la técnica MLSA, junto con otros genes para determinar las relaciones filogenéticas de especies difíciles de clasificar, como las del género *Microbispora*. Obtuvieron un árbol filogenético con una resolución taxonómica confiable, lo que aportó al mejor entendimiento de la evolución del género.

Ahmadi et al. (2018) en Irán, determinaron las diferencias genéticas de 20 cepas de *Pseudomonas* mediante el uso de la técnica multilocus de los genes *gapA*, *rpoD*, *gyrB* y *gltA*. Determinaron que el análisis de los genes *gyrB* y *rpoD* eran suficientes para la identificación y análisis filogenético. Asimismo, mediante este estudio determinaron que todas las cepas tenían el mismo origen geográfico.

Bunpa et al. (2018) en Tailandia, identificaron cepas de *Vibrio alginolyticus* y para determinar su grado de heterogeneidad. Analizaron secuencias del gen *gyrB* amplificadas mediante la técnica AP-PCR, el cual mostró mejores resultados frente a otros genes debido a su alta especificidad, incluso frente a una baja concentración de la bacteria. Concluyeron que a pesar de ser cepas de la misma especie, sus secuencias de ADN eran distintas.

Wei et al. (2018) en Korea, identificaron diferentes especies del grupo *B. cereus*, especialmente *B. cereus* y *B. thuringiensis*, usando dos diferentes biomarcadores, *groEL* y *gyrB*. Determinaron que este último mostró mayor especificidad y por lo tanto es una alternativa efectiva frente a los métodos tradicionales, los cuales presentan desventajas como la baja detectabilidad y falsos positivos.

Özdemir y Arslan (2019) en Turquía, identificaron especies del género *Bacillus* amplificando y secuenciando los genes *16SrRNA*, *gyrB* y *rpoB* mediante PCR. Demostraron que el gen *rpoB* poseía cierta deficiencia para discriminar especies de los grupos *B. cereus* y *B. circulans*, proporcionando

un árbol filogenético distinto e incongruente a los obtenidos por los otros genes. Concluyeron que el gen *gyrB* era la mejor opción para una discriminación y análisis filogenético confiable.

1.1.2. Antecedentes a nivel nacional y local:

A nivel nacional y local no existen estudios relacionados con el análisis del gen *gyrB* para determinar variabilidad filogenética en cepas bacterianas o identificación de *B. thuringiensis* a nivel molecular.

1.2. Bases teóricas de la investigación:

1.2.1. Variabilidad filogenética de *B. thuringiensis*

1.2.1.1 Variabilidad filogenética:

Filogenia es el patrón de relaciones evolutivas históricas entre especies y taxones de nivel superior que frecuentemente se presenta como un árbol diagrama, o árbol filogenético (30). También se considera como el patrón de ramificación de las relaciones ancestro-descendiente entre “taxones”, como especies o sus genes (31).

Las filogenias se pueden utilizar para resumir las similitudes anticipadas entre especies en los rasgos que afectan sus posibles interacciones abióticas y bióticas dentro de las comunidades (32).

El término filogenética se aplica al estudio las relaciones de grupos de organismos como reflejo de su historia evolutiva (33). Asimismo,

es el proceso de intentar estimar estas relaciones históricas por examinación de información como ADN, secuencias de proteínas, o características morfológicas (forma) desde taxones existentes (31).

La variabilidad filogenética de especies (PSV) cuantifica cómo la relación filogenética disminuye la varianza de un rasgo hipotético no seleccionado y compartido por todas las especies de una población (32). Asimismo, resume el grado en que las especies de una comunidad están relacionadas filogenéticamente (32).

La genética de poblaciones estudia la variabilidad genética de las poblaciones naturales. Al cambiar la composición genética de las poblaciones se produce el proceso evolutivo de la especie (34).

1.2.1.2. *Bacillus thuringiensis*:

B. thuringiensis pertenece a la familia *Bacillaceae* y se ubica dentro del grupo I del género *Bacillus*; forma parte del grupo de *Bacillus cereus*, el que incluye a *B. anthracis*, *B. cereus*, *B. mycoides*; así como a los más recientemente descritos *B. pseudomycoides* y *B. weihenstephanensis* (10,35).

B. thuringiensis es un bacilo Gram positivo, de flagelación peritrica, mide de 3 a 5 µm de largo por 1 a 1,2 µm de ancho y desarrolla esporas de resistencia de forma elipsoidales que no provocan el hinchamiento del perfil bacilar (5).

La característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (5). Esta bacteria es el bioinsecticida más utilizado para el control de larvas de insectos plaga, ya que representa aproximadamente el 90% del mercado de biopesticidas (36).

B. thuringiensis se clasifica en 84 serovares mediante serología del antígeno flagelar H (3,4). Asimismo, la diversidad de *B. thuringiensis* se manifiesta por la variabilidad de los genes *cry* y sus respectivas proteínas Cry biotóxicas, además de variaciones a lo largo de su genoma, como en las regiones extragénicas repetitivas (REP); por ello, es importante estudiar la diversidad genética molecular para evaluar su potencial bioinsecticida (37).

1.2.2. Gen *gyrB*

La enzima ADN girasa, es una topoisomerasa de tipo II que se encuentra en bacterias (38). Esta enzima es esencialmente importante debido a que media el superenrollamiento negativo del cromosoma bacteriano, lo que afecta los procesos de replicación, transcripción, recombinación y reparación del ADN (10).

El gen que codifica la subunidad β de esta enzima, llamado *gyrB*, es ampliamente utilizado en taxonomía bacteriana (39), debido a que es de

distribución universal y su presencia en monocopia permite la discriminación e identificación de especies fuertemente relacionadas; como en el caso de los pertenecientes a los géneros *Aeromonas*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Vibrio*, y también enterobacterias, micobacterias y bacterias ácido lácticas (9).

1.2.2.1. Genes como marcadores moleculares:

Un marcador molecular es un segmento de ADN que posee una ubicación específica en un cromosoma y cuya herencia puede seguirse en los individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o regiones sin función conocida (40)

Se ha documentado la aplicación de diversos genes como marcadores filogenéticos, entre ellos *16SrRNA* (41), *rpoB* (42), *repA* (43) y *gyrB* (6). En el caso de *gyrB*, se considera un buen marcador filogenético para la sistemática bacteriana debido a que en las diferentes especies la secuencia nucleotídica de este gen tiene una tasa de sustitución sinónima media que es casi cuatro veces mayor que la del gen *16SrRNA* (44).

1.3. Marco conceptual:

- **Identificación fenotípica:** Identificación bacteriana que se basa en las características observables de las bacterias, como su morfología, desarrollo, y propiedades bioquímicas y metabólicas (9).

- **Fenotipo:** Rasgos o características expresados de un organismo, independientemente de si los rasgos son el resultado del genotipo o el medio ambiente, o de la interacción de ambos (45).
- **Identificación molecular:** Identificación que se basa en la secuencia o composición constitutiva de regiones específicas de los ácidos nucleicos más que en los productos de su expresión (46).
- **Serovar:** También llamado serovariedad, es una variación distinta dentro de una especie de bacteria, virus o entre células inmunes de diferentes individuos. Estos subgrupos se diferencian en función de sus antígenos de superficie celular, permitiendo la clasificación de organismos a nivel de subespecies (47).
- **Nucleótidos:** Subunidad de ADN o ARN que consta de una base (adenina, guanina, timina o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo o citosina en el ARN), un fosfato y una molécula de azúcar (desoxirribosa en el ADN y ribosa en el ARN) (48).
- **ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Polímero construido de nucleótidos sucesivos unidos por enlaces fosfodiéster en dos hebras antisentido. Material de que están compuestos los genes y lleva la información genética (45).
- **Gen:** Es una secuencia ordenada de nucleótidos que permiten la expresión de un ARN o una proteína. Los genes son la principal unidad funcional de la herencia (48).

- **Genes de mantenimiento celular (“housekeeping”):** Son ejemplos de regiones en un genoma que tienden a estar altamente conservadas y evolucionan más lentamente que otros genes, principalmente debido a su rol en el mantenimiento de las funciones celulares básicas y son esenciales para la existencia de una célula (49).
- **PCR (Reacción en cadena de la polimerasa):** Procedimiento que entraña ciclos múltiples de desnaturalización, renaturalización y síntesis de polinucleótidos que amplifica una secuencia particular de ADN (50).
- **Secuenciación:** Determinación del orden de los nucleótidos en un ADN o ARN. La secuenciación también se refiere a extraer el orden de los aminoácidos en las proteínas (48).
- **Amplificación:** La amplificación es la producción, por un procedimiento tecnológico, de numerosas copias de un gen, un plásmido o cualquier molécula con información genética (50).
- **Electroforesis:** El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas como cationes o como aniones (51).
- **Árbol filogenético:** Es un grafo que describe las relaciones de parentesco, ancestría y descendencia, entre un conjunto de genes, organismos, especies o

de taxa superiores (52). Es una forma intuitiva de inferir relaciones entre copias de un gen o entre loci de una familia multigénica (13).

- **Reconstrucción filogenética:** Son métodos estadísticos de inferencia de una filogenia a partir de datos moleculares, la cual es una práctica muy efectuada en biología evolutiva y taxonomía (53). Estos métodos se pueden clasificar en dos principales enfoques: métodos basados en la distancia y métodos basados en caracteres (54).
- **Análisis “bootstrap”:** Es una de las formas más populares de evaluar la confiabilidad de una inferencia filogenética (55). Es una técnica estadística de remuestreo con reemplazamiento, donde a partir de un alineamiento original se generan pseudoréplicas muestreando aleatoriamente una proporción concreta de las columnas (sitios) del alineamiento original. En este muestreo se escogen columnas al azar para generar las pseudoréplicas, pudiendo incluir una misma columna varias veces mientras que otras nunca se incluirán (52).
- **Secuencias homólogas:** Dos secuencias o estructuras son homólogas cuando comparten más similitud de la que se podría esperar. Cuando se observa un exceso de similitud, la explicación más simple de ese exceso es que las dos secuencias no surgieron de forma independiente sino que surgieron de un antepasado en común (56).

- **Similitud:** La similitud refleja la proporción de sitios que son idénticos por estado de carácter (57). Se puede definir como una medida del grado en que dos las secuencias se parecen; por tanto, es cuantitativa y está representada por una puntuación o porcentaje (58).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

2.1. Situación problemática:

En el Laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología de la Universidad Nacional San Luis Gonzaga se dispone de cepas de *B. thuringiensis* las cuales fueron aisladas a partir de larvas de *Copitarsia incommoda*, identificadas y clasificadas por métodos microbiológicos y bioquímicos. Sin embargo, este tipo de clasificación puede brindar resultados erróneos (9) y limitar la determinación de la relación filogenética entre las cepas (5–7). Estas relaciones cuando son bien definidas brindan conocimientos importantes sobre la estructura, distribución y variación entre las poblaciones de microorganismos (14).

2.2. Formulación de problemas:

2.2.1. Problema general:

¿Cuál es el grado de variabilidad filogenética que presentan las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*, conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG, en base a la secuencia nucleotídica del gen *gyrB*?

2.2.2. Problemas específicos:

- a) ¿A qué serovares de la especie *B. thuringiensis* pertenecen las cepas conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG?

- b) ¿Cuál es la relación filogenética existente entre las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*, conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG, en base a la secuencia nucleotídica del gen *gyrB*?
- c) ¿Cuál es el grado de similitud entre de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* entre de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*?

2.3. Delimitación del problema

- **Delimitación espacial o geográfica:** Las cepas estudiadas se aislaron de larvas de *C. incommoda* provenientes del caserío Cachiche (C) y del distrito de Salas Guadalupe (G).
- **Delimitación social:** Las poblaciones que viven cerca de cultivos agrícolas están expuestas a aplicaciones de tóxicos sobre los cultivos y el manejo de bioinsecticidas como *B. thuringiensis* debidamente identificados y caracterizados es la opción segura y no toxica para las personas que manejan controles biológicos, como en el tratamiento de plagas causadas por larvas de insectos clave en nuestra Región como el caso de *C. incommoda*.
- **Delimitación conceptual:** En el presente trabajo de investigación se analizó las variaciones nucleotídicas del gen *gyrB* de cepas de *B. thuringiensis*, el cual es un gen con un alto grado de evolución que permite discriminar entre especies estrechamente relacionadas.

2.4. Justificación e importancia de la investigación:

2.4.1. Justificación:

La clasificación de *B. thuringiensis* se ha basado principalmente en las características bioquímicas y morfológicas (8). Sin embargo, la identificación bioquímica no es suficiente para discriminar entre *B. thuringiensis* y los miembros de su mismo grupo. Por lo que, se considerarán a las inclusiones protéicas paraesporales como la única característica que permite la diferenciación entre ellas (5,59).

En la actualidad, la forma de diferenciar las subespecies entre cepas de *B. thuringiensis* se realiza mediante ensayos de serotificación del antígeno flagelar H (3–5). Este método presenta algunas limitaciones para discriminar entre cepas de *B. thuringiensis* y cepas de *B. cereus*, debido a la existencia de reacciones cruzadas que dificultan la identificación de cepas de *B. thuringiensis* que han perdido la capacidad de formar flagelos y de cepas que pertenecen a un mismo serovar, limitando la determinación de la relación filogenética entre las cepas (5–7).

Frente a las dificultades antes descritas, se han desarrollado diversas técnicas moleculares de identificación o diferenciación de cepas en las que se utiliza la información de diversos genes (60), siendo los más usados los genes: *16SARNr* (*rrs*), *16S-23SARNr* (ITS), *ARNr23S*, *rpoB* y *gyrB* (9).

En el caso de *B. thuringiensis*, el alto grado de similitud del gen *16SrRNA* entre especies estrechamente relacionadas no ha permitido una discriminación confiable (9). Por otro lado, el gen *gyrB*, que codifica la subunidad β de la enzima ADN girasa, presenta un grado de evolución mayor en comparación con el gen *16SrRNA*, lo que le confiere mayor capacidad para discriminar entre especies estrechamente relacionadas e incluso para discriminar a nivel de subespecie (6,10).

La diferenciación o agrupación de los microorganismos según sus características genotípicas y fenotípicas permiten el seguimiento de cepas dispersas en el medio ambiente y el descubrimiento de nuevas cepas. Sin embargo, esta se debe complementar con un análisis filogenético con base en pruebas moleculares que permita determinar las relaciones evolutivas de las mismas, las cuales involucran a la variación de las secuencias de ADN y la herencia generacional de estos cambios a lo largo del tiempo (7).

2.4.2. Importancia:

El desarrollo del presente trabajo proporciona información sobre las relaciones filogenéticas de cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* en la ciudad de Ica, para comprender su desarrollo y distribución como especie en el medio ambiente. Asimismo, la identificación de cepas nativas que presenten mejor adaptabilidad a los cambios ambientales y mayor capacidad de supervivencia que las cepas comerciales foráneas, son datos importantes para la explotación de sus

propiedades bioinsecticidas benéficas y de aplicación para el beneficio del sector agroalimentario y del medio ambiente en general. Además, la aplicación de técnicas modernas de diferenciación de especies bacterianas a nivel de serovar genera antecedentes para futuras investigaciones a nivel local o nacional.

2.5. Objetivos de investigación:

2.5.1. Objetivo general:

Determinar el grado de variabilidad de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* con base a las variaciones de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB*.

2.5.2. Objetivos específicos:

- a) Identificar a nivel de serovar de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* mediante el análisis del gen *gyrB*.
- b) Determinar la relación filogenética de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* con base a la secuencia del gen *gyrB*.
- c) Determinar el grado de similitud de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* entre de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*.

2.6. Hipótesis de investigación:

2.6.1. Hipótesis general:

Las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda* presentan un alto grado de variabilidad filogenética según el análisis de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB*.

2.6.2. Hipótesis específicas:

- a) Las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*, conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG se identifican dentro de diversos serovares mediante el análisis del gen *gyrB*.
- b) Las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*, conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG mediante el análisis del gen *gyrB* muestran una alta relación entre ellas ya que todas fueron aisladas dentro de la Región Ica.
- c) Las cepas de *B. thuringiensis* aisladas de *C. incommoda*, conservadas en el Laboratorio de Biotecnología-UNSLG mediante el análisis del gen *gyrB* presentan un bajo grado de similitud entre sus secuencias nucleotídicas.

2.7. Variables de investigación:

2.7.1. Identificación de variables:

- Variable dependiente: Variabilidad filogenética de cepas de *B. thuringiensis*
- Variable independiente: Análisis de la secuencia del gen *gyrB*

2.7.2. Operacionalización de variables:

Variable	Tipo de variable	Definición de variable	Dimensiones	Indicadores
Análisis del gen <i>gyrB</i>	Independiente	Estudio de la secuencia nucleotídica del gen <i>gyrB</i>	Composición nucleotídica Variaciones de secuencias nucleotídicas entre individuos	Secuenciación Alineamiento E- value Maximo score Total score
Variabilidad filogenética de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	Dependiente	Grado en que las especies de una comunidad están relacionadas filogenéticamente	Diversidad de serovares dentro de una misma especie Relaciones evolutivas entre individuos de una misma especie Diferencias entre secuencias de un mismo gen	Identificación molecular Construcción de árboles filogenéticos Porcentaje de similitud entre secuencias

CAPÍTULO III

ESTRATEGIA METODOLÓGICA / METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

3.1. Tipo, nivel y diseño de la investigación

- Tipo de investigación: Básica
- Nivel de investigación: Descriptivo
- Diseño de investigación: No experimental

3.2. Población y muestra materia de investigación

- Población de estudio: Secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* de *B. thuringiensis*
- Muestra de estudio: Secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* de 14 cepas de *B. thuringiensis*, asignadas con los códigos: C-9, C-12, C-22, C-50, C-62, C-81, C-92, C-245, C-246, C-257, C-258, G-171, G-181, G-189, G-203, aisladas de larvas de *C. incommoda* que pertenecen al cepario del laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional San Luis Gonzaga.

CAPÍTULO IV

TÉCNICAS E INSTRUMENTOS DE INVESTIGACIÓN

4.1. Técnicas de recolección de datos

Para el desarrollo de este trabajo de investigación se emplearon las siguientes técnicas para la recolección de datos:

- Reactivación de cepas bacterianas mediante uso de medios de cultivo microbiológicos.
- Extracción de ADN bacteriano mediante kit comercial
- Amplificación de genes mediante PCR usando kit comercial
- Manejo de programas bioinformáticos para comparación de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.

4.2. Instrumentos de recolección de datos

Se usó la observación como instrumento de recolección de datos del análisis de comparación de secuencias nucleotídicas para determinar los grados de similitud y elaboración de árboles filogenéticos.

4.3. Técnica de procesamiento de datos, análisis e interpretación de resultados

4.3.1. Reactivación de cepas de *B. thuringiensis*:

Se colectaron lavas de lepidópteros de tercer y cuarto estadio. De éstas se seleccionaron 32 larvas, se lavaron con solución salina fisiológica (SSF,

NaCl 0.85%) estéril y luego se trituraron con la ayuda de un mortero. Posteriormente, las larvas trituradas se vertieron en un frasco Schott que contenía 35 ml de agua peptonada al 0.1% para formar preparado llamado caldo larva. Se distribuyó 2 ml de caldo larva en tubos de vidrio de 13x100 mm con tapa rosca y se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min. En cada uno de los viales se inocularon las cepas y se incubaron a 37°C por 24h.

Las cepas activadas en caldo larva se llevaron a un tratamiento térmico en baño maría a 60°C por 10 min. De cada tubo se tomó una alícuota y se sembró por agotamiento y estría en placas con agar nutritivo y se incubaron a 37°C por 24 h. A continuación, se seleccionaron las colonias con características típicas de *B. thuringiensis* (Colonias grandes, planas, opacas, de color blanco grisáceo y con bordes irregulares) y se inoculó una asada de cada cepa en tubos con agar nutritivo inclinado. Estos se incubaron a 37°C por 24 h.

Se realizó la verificación de producción de cristales con la finalidad de descartar *Bacillus* contaminantes. Para ello, se inoculó una asada de cada cepa en caldo nutritivo y se incubaron a 37°C por 72 h. Luego se realizaron observaciones microscópicas (1000X) de extensiones realizadas en láminas portaobjetos y coloreadas con azul de Coomassie 0.1% durante 1 min.

4.3.2. Extracción de ADN:

Se utilizó el kit de purificación de ADN Wizard® Genomic (Promega®) y se siguió el protocolo sugerido de fábrica: Para cada cepa se tomó una asada de cultivo conservado en agar nutritivo inclinado, se sembró por agitación en dos tubos Falcon con 5 ml de medio LB y se incubaron a 37°C por 8 h. Luego, los tubos se colocaron en hielo durante 5 min y se centrifugaron a 6000 RPM por 5 min. Se descartó el sobrenadante y se agregó a cada tubo 500 µl de agua destilada estéril helada y se pipeteó hasta homogenizar la suspensión celular. Luego, el contenido de ambos tubos se trasvasaron a un tubo Eppendorf de 1.5 ml y centrifugaron a 6000 RPM por 5 min. Se removió el sobrenadante y resuspendió el precipitado con 480 µl de EDTA 50 mM, se añadió 120 µl de lisozima (10 mg/ml) e incubó el preparado a 37°C por 60 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 6000 RPM por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se resuspendió con 600 µl de solución de lisis nucleica, incubó en baño maría a 80°C por 5 min y luego se enfrió a temperatura ambiente. Posteriormente, se añadió 3 µl de RNasa y se mezcló por inversión durante 5 veces e inmediatamente se incubó a 37°C por 15 min. El tubo se enfrió a temperatura ambiente y se añadió 200 µl de solución de precipitación de proteínas. Se aplicó agitación mediante vortex a máxima velocidad por 20 segundos. Luego, la mezcla se incubó en hielo por 5 min y centrifugó a 14000 RPM por 3 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf nuevo de 1.5 ml conteniendo 600 µl de isopropanol y se mezcló por inversión cuidadosamente hasta que las hebras de ADN se hicieron visibles. A continuación se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Cuidadosamente se eliminó el sobrenadante, se

agregó 600 µl de etanol al 70% y se invirtió el tubo 10 veces para lavar el sedimento de ADN. Posteriormente, se centrifugó a 14000 rpm por 2 min. Con ayuda de una pipeta se retiró cuidadosamente el sobrenadante y el tubo con el sedimento se dejó secar sobre papel absorbente por 10 minutos. Se agregó 100 µl de solución de rehidratación de ADN y se conservó a 4°C durante toda la noche. Finalmente, el ADN se almacenó en congelamiento a -20 °C.

La verificación de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE. Las muestras se prepararon mezclando 1 µl de tampón de carga con 5 µl de solución de ADN. Una vez colocadas las muestras en los pocillos del gel se aplicó corriente a 50 V por 1 hora. A continuación, el gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio (0.1 µg/ml) por 3 min y lavó con agua destilada por 30 min. Finalmente, el gel se observó en un transiluminador Biotop a 320 nm.

4.3.3. .Amplificación del gen *gyrB* mediante PCR:

El gen *gyrB* de las cepas en estudio fue amplificado mediante PCR según lo descrito por Soufiane et al. (2009). Los partidores utilizados fueron los siguientes:

gyrB-F1: 5'-ATGGAACAAAAGCAAATGCA-3'

gyrB-R1: 5'-TTAAATATCAAGGTTTTTCA-3'

Las reacciones de PCR se realizaron en 50 µl de volumen final, con los componentes indicados en la Tabla 1.

Tabla1. Componentes de reacción de PCR para amplificar el gen *gyrB* de *B. thuringiensis*

Componente	Vol (µl)
Agua calidad molecular	22
Master Mix (2X) de Thermo Scientific	25
Partidor directo gyrBF (20 pmol/µl)	1
Partidor reverso gyrBR (20 pmol/µl)	1
ADN molde (100 ng/µl)	1
Volumen final	50

Después de mezclar suavemente todos los componentes, se adicionó 20 µl de aceite mineral y se centrifugó a 12000 rpm por pocos segundos. La reacción de PCR se realizó utilizando un termociclador JM Research PTC150, siguiendo el programa propuesto por Soufiane et al. (2009), el cual fue el siguiente: desnaturalización inicial del ADN a 95 °C por 5 min; seguido por 30 ciclos de amplificación (desnaturalización a 95°C por 30 s, hibridación de partidores a 46 °C por 30 s y extensión a 72 °C por 30 s) y extensión final a 72°C por 5 min.

La verificación de productos amplificados por PCR se realizó mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% en TAE. Para comparar el tamaño de los amplificados se utilizó un marcador de peso molecular

GeneRuler 1kb DNA Ladder, siguiendo el procedimiento anteriormente descrito para la verificación de ADN.

4.3.4. Secuenciación de amplificadores de PCR

Los productos de amplificación del gen *gyrB* obtenidos por PCR se almacenaron a -20 °C hasta su remisión a secuenciación a la empresa MacroGen USA (<https://lims.psomagen.com/>), según las indicaciones y la información solicitada en los formatos de remisión (<https://lims.psomagen.com/support/seq/down.jsp>). De cada producto de amplificación se remitió 20 µl (50 ng/ul) y de cada partidor 50 µl (20 pmol/µl). Ambos fueron preparados en tubos Eppendorf de 1.5 ml de calidad molecular según las indicaciones de la empresa.

4.3.5. Búsqueda de homólogos en la base de datos “Genbank”

Para lograr la identificación de las cepas de *B. thuringiensis* a nivel de serovar los productos de PCR secuenciados, recibidos en formato texto se convirtieron a formato FASTA, en archivo Word. Luego, se aplicaron en el algoritmo “Basic Local Alignment Search Tool”, BLASTn del Centro Nacional para la Información Biotecnológica (“National Center for Biotechnology Information”, NCBI), disponible en: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch, para la búsqueda de secuencias homólogas de nucleótidos de la base de datos (56,61). Se seleccionó la opción de base de datos la opción “nucleotide collection (nr/nt) y la programación “Somewhat similar sequences (blastn)”.

El serovar de cada cepa de *B. thuringiensis* se determinó teniendo en cuenta los parámetros establecidos por Hall (2018) y Pearson (2014) quienes consideran los valores más altos de “Max. score” (puntuación de la mejor secuencia alineada) y “Total score” (suma de puntuaciones de todas las secuencias alineadas) para la selección de secuencias homólogas, debido a que cuanto más altos son estos puntajes más estrechamente relacionada estará la secuencia de consulta con la secuencia objetivo en la base de datos. Así mismo, se consideraron los valores E (“E value”) más cercanos a 0, el cual es un parámetro que proporciona una estimación de significancia estadística de la similitud. Es decir, cuanto más cerca de cero esté el valor E, es más probable es que el resultado sea un homólogo de la secuencia de consulta.

4.3.6. Alineamiento múltiple de secuencias nucleotídicas

El paso inicial en el análisis filogenético es el alineamiento de las secuencias en estudio, para representar la homología de posiciones de los nucleótidos y compararlas entre sí con la finalidad de determinar un origen evolutivo común y facilitar la posterior construcción de árboles filogenéticos (52). Para obtener el alineamiento, las secuencias del gen *gyrB* de las cepas de *B. thuringiensis*, identificadas con su respectivo serovar y ordenadas en formato FASTA en archivo Word, se procesaron en el programa MEGA-X versión 10.1.8 disponible para libre descarga en: <https://www.megasoftware.net/>.

Se inició con la creación de un alineamiento (ALIGN) en “Edit/build alignment” con la opción “Create a new alignment” y designando el “data type for alignment” como DNA. Usando la opción “Edit” se pegó la secuencia y se procesó el alineamiento usando el sub-programa MUSCLE incorporado en MEGA-X. Se aceptó la configuración por defecto para el alineamiento de secuencias nucleotídicas. El alineamiento generó una data que se guardó asignando un nombre en formato MAS, compatible con MEGA-X. Este archivo fue utilizado en la construcción del árbol filogenético.

4.3.7. Construcción de árboles filogenéticos:

4.3.7.1. Selección de un modelo de sustitución nucleotídica

Para realizar el análisis filogenético se escogió un modelo para describir cómo evolucionaron las secuencias en estudio (62). Para ello, se utilizó el alineamiento generado previamente con MEGA-X el cual se convirtió a un archivo de formato NEXUS usando el programa MABL: (http://phylogeny.lirmm.fr/phylo_cgi/data_converter.cgi), y luego este archivo se procesó con el programa PAUP4: (<http://phylosolutions.com/paup-test/>) para obtener el mejor modelo de sustitución de nucleótidos. Se sugirió el modelo “General Time Reversible” (GTR+G), elegido por AICc (63,64).

4.3.7.2. Reconstrucción filogenética:

Los árboles filogenéticos se construyeron con el programa MEGA-X. Se ingresó en la herramienta “Phylogeny” y se seleccionó el método de reconstrucción filogenética “maximum likelihood tree” o árbol de máxima verosimilitud (ML). Esta opción desplegó una ventana de preferencias en donde se escogió el modelo de tiempo general reversible (GTR), sugerido por el programa PAUP4. Dentro de esta ventana de preferencias se realizó también los ajustes para la prueba “bootstrap” seleccionando la opción de 1,000 repeticiones de muestras aleatorias de sitios de alineación, así como para la construcción de los árboles iniciales donde se seleccionó los algoritmos “Neighbour-Join” y “BioNJ”. Se eliminaron todas las posiciones con menos del 95% de cobertura del sitio. Es decir, se permitieron menos del 5% de gaps de alineación, datos faltantes y bases ambiguas en cualquier posición.

4.3.8. Construcción de la matriz de identidad:

Para obtener los respectivos porcentajes de similitud entre secuencias se realizó la comparación de pares con el programa online CLUSTAL OMEGA disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/> donde se seleccionó la opción para ingresar secuencias de ADN. Luego de ingresar las secuencias en formato FASTA, se inició el análisis con el botón

“Submit”. La matriz de identidad se encontró en la pestaña "Result Summary" dentro de la ventana de resultados.

CAPÍTULO V

PRESENTACIÓN, INTERPRETACIÓN Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

5.1. Presentación e interpretación de resultados:

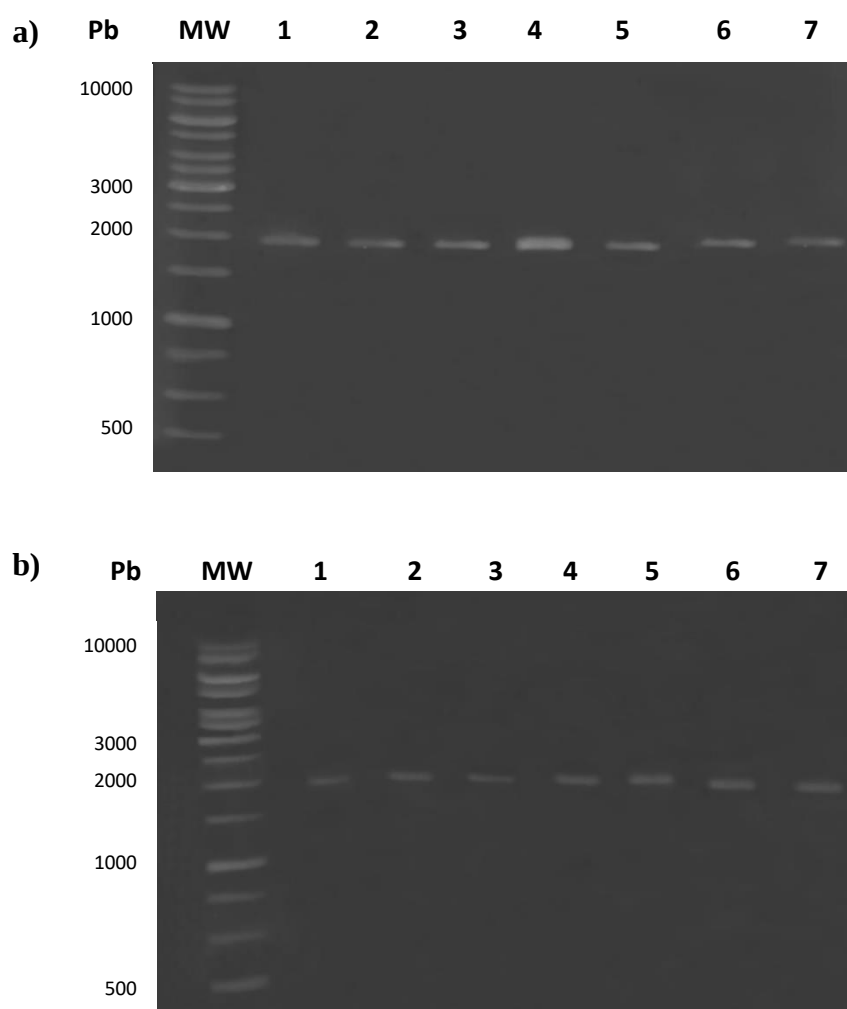


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 1% de los productos amplificados por PCR usando partidores específicos para el gen *gyrB*. A) Carriles: 1, cepa C-9; 2, cepa C-12; 3, cepa C-22; 4, cepa C-50; 5, cepa C-62; 6, cepa C-81; 7, cepa C-92. B) Carriles: 1, cepa G-171; 2, cepa G-181; 3, cepa G-189; 4, cepa G-203; 5, cepa C-245; 6, cepa C-246; 7, cepa C-257., MW, estándar (100 pb, Thermoscientific).

Tabla 2. Similitud de secuencias *gyrB* de cepas de *B. thuringiensis* con la base de datos del Genbank obtenida mediante BLASTN.

Cepa	Similitud a	Acceso	Max. score	Total score	Valor E	Cobertura (%)	Identidad (%)
C-9	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	665	1924	0.0	98	97.71
C-12	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	309	815	1e-79	95	78.65
C-22	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>galleriae</i>	CP010089.1	332	4349	3e-86	75	85.71
C-50	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>galleriae</i>	CP010089.1	142	1921	3e-29	51	76.96
C-62	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>poloniensis</i>	EF210281.1	328	328	8e-85	60	75.88
C-81	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	545	1462	9e-151	98	86.53
C-92	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	955	2493	0.0	96	94.50
G-171	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	1802	4295	0.0	99	97.15
G-181	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>poloniensis</i>	EF210281.1	969	969	0.0	96	80.90
G-189	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>poloniensis</i>	EF210281.1	841	841	0.0	93	81.38
G-203	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	1538	3710	0.0	98	97.51
C-245	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>poloniensis</i>	EF210281.1	1040	1040	0.0	69	94.06
C-246	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>poloniensis</i>	EF210281.1	843	843	0.0	94	91.58
C-257	Indeterminado*	-	-	-	-	-	-
HD-1	<i>B. thuringiensis</i> serovar <i>kurstaki</i>	CP004870.1	1697	4105	0.0	89	94.60

* Cepa cuya secuencia poseen más de una similitud en el Genbank.

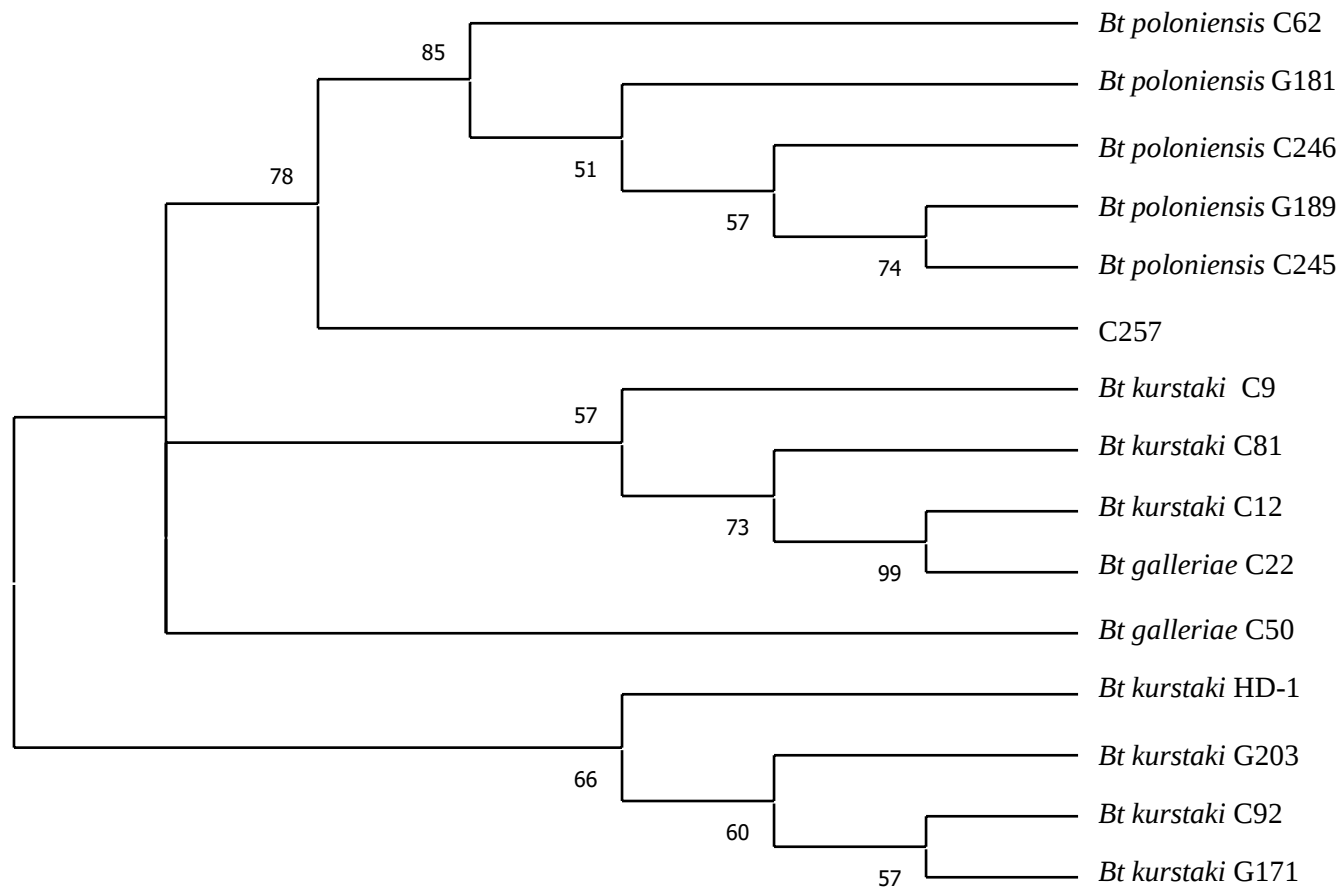


Figura 2. Árbol de máxima verosimilitud Bootstrapped de las cepas de *B. thuringiensis* originado por el alineamiento de las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB*. Se observan valores bootstrap mayores de 50%. Los números del I al V hacen referencia a los 5 clusters generados.

Tabla 3. Matriz de identidad creada con ClustalW. Se observan los porcentajes de similitud generados por la comparación de pares de secuencias nucleotídicas del gen *gyrB*.

	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)	(14)	(15)
(1) <i>Bt poloniensis</i> G-181	100	87.60	75.00	72.68	71.32	73.32	69.72	64.21	72.14	68.16	34.83	33.61	62.06	72.53	64.97
(2) <i>Bt poloniensis</i> C-246	87.60	100	85.02	79.65	76.03	76.36	78.18	68.61	78.34	83.44	36.24	34.07	60.13	74.93	68.58
(3) <i>Bt poloniensis</i> G-189	75.00	85.02	100	72.17	74.12	74.88	68.57	66.16	70.25	67.36	34.45	33.70	56.37	75.27	68.43
(4) <i>Bt kurstaki</i> G-203	72.68	79.65	72.17	100	82.18	89.67	92.32	69.17	93.23	74.52	33.33	33.70	57.97	82.29	74.40
(5) C-257	71.32	76.03	74.12	82.18	100	81.34	80.35	64.25	80.98	79.41	31.65	32.04	51.32	72.66	66.81
(6) <i>Bt kurstaki</i> C-92	73.32	76.36	74.88	89.67	81.34	100	91.22	67.88	91.71	83.72	32.68	33.52	54.95	81.68	72.77
(7) <i>Bt kurstaki</i> HD-1	69.72	78.18	68.57	92.32	80.35	91.22	100	67.18	90.55	72.62	32.87	32.87	57.27	83.25	73.42
(8) <i>Bt kurstaki</i> C-12	64.21	68.61	66.16	69.17	64.25	67.88	67.18	100	67.44	63.31	37.88	37.31	43.33	65.50	63.54
(9) <i>Bt kurstaki</i> G-171	72.14	78.34	70.25	93.23	80.98	91.71	90.55	67.44	100	73.27	33.43	32.87	57.84	83.03	73.70
(10) <i>Bt poloniensis</i> C-245	68.16	83.44	67.36	74.52	79.41	83.72	72.62	63.31	73.27	100	32.02	32.32	55.57	77.02	68.26
(11) <i>Bt galleriae</i> C-22	34.83	36.24	34.45	33.33	31.65	32.68	32.87	37.88	33.43	32.02	100	55.65	37.18	31.98	36.34
(12) <i>Bt galleriae</i> C-50	33.61	34.07	33.70	33.70	32.04	33.52	32.87	37.31	32.87	32.32	55.65	100	36.39	34.29	38.01
(13) <i>Bt poloniensis</i> C-62	62.06	60.13	56.37	57.97	51.32	54.95	57.27	43.33	57.84	55.57	37.18	36.39	100	51.56	46.64
(14) <i>Bt kurstaki</i> C-9	72.53	74.93	75.27	82.29	72.66	81.68	83.25	65.50	83.03	77.02	31.98	34.29	51.56	100	80.60
(15) <i>Bt kurstaki</i> C-81	64.97	68.58	68.43	74.40	66.81	72.77	73.42	63.54	73.70	68.26	36.34	38.01	46.64	80.60	100

Tabla 4. Valores de significancia en relación a los porcentajes de similitud entre secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* de *B. thuringiensis* obtenidos en la matriz de identidad.

Similitud de secuencias nucleotídicas de <i>gyrB</i>	
Valor estadístico	Similitud (%)
Medio	68.26
Promedio	62.60
Más bajo	31.65
Más alto	93.23

5.2. Discusión de resultados:

En el presente trabajo de investigación se determinó la variabilidad filogenética de 14 cepas de *B. thuringiensis* aisladas de larvas de *C. incommoda* mediante el análisis de las secuencias del gen *gyrB* teniendo en cuenta la diversidad de serovares dentro de la especie así como el porcentaje de similitud entre secuencias. Las secuencias del gen *gyrB* fueron amplificadas mediante el uso de partidores diseñados para los extremos de la secuencia (*gyrB*-F1, *gyrB*-R1) (Tabla 1) por Soufiane et al. (2009) quienes emplearon este set de partidores además de un segundo par para amplificar la región central del gen *gyrB* (*gyrB*-F2, *gyrB*-R2) obteniendo amplificados del tamaño esperado (1700 pb) tal como se obtuvieron en este trabajo. Esto sugiere que los partidores *gyrB*-F1 y *gyrB*-R1 fueron adecuados para amplificar una región analizable correspondiente al gen *gyrB*. Sobre la técnica empleada para la amplificación del gen *gyrB*, los resultados fueron consistentes con lo obtenido por Wei et al. (2018), quienes amplificaron el gen *gyrB* del 100% de cepas de *B. thuringiensis* estudiadas mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), usando partidores específicos para el gen *gyrB*. Si bien en el presente trabajo no se empleó PCR cuantitativo, los resultados indican la reproducibilidad y efectividad de la técnica de PCR convencional para la identificación de *B. thuringiensis*.

Los valores de expectancia (Valor E) obtenidos en el algoritmo BLASTn fueron cero o muy cercanos a cero, mientras que el porcentaje mínimo de similitud entre secuencias nucleotídicas fue 75.88% y el máximo 97.71% (Tabla 2). Estos datos indican que la homología de las cepas de *B. thuringiensis* con las secuencias almacenadas en la base de datos era confiable, según lo descrito por Hall (2018), quien

considera homólogos a aquellas secuencias que tengan un valor de expectancia más cercano a 0; por otro lado Pearson (2014) menciona que si dos secuencias tienen un porcentaje de identidad $\geq 30\%$ estos se infieren como homólogos. Se confirma que el análisis de las secuencias del gen *gyrB* es suficiente para distinguir entre serovares de *B. thuringiensis* tal como lo asegura Soufiane et al. (2009). De las 14 cepas en estudio 13 se lograron identificar a nivel de serovar, 7 de ellas se identificaron como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* (C-9, C-12, C-81, C-92, G-171, G-203), 5 como *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* (C-62, C-245, C-246, G-181, G-189) y 2 como *B. thuringiensis* serovar *galleriae* (C-22, C-50). La cepa C-257 no se logró identificar debido a que presentaba similitud con varios serovares depositados en la base de datos del NCBI. Esto sugiere que se trata de una posible cepa nativa no identificada, la ausencia de cepas similares en la base de datos o que requiere mayor estudios para obtener su verdadera identidad. Además, la cepa control HD-1, cepa comercial identificada como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, mediante este procedimiento se encontró en la base de datos con la misma identificación. El alto porcentaje de identificación a nivel de serovar, 13 cepas (92.9 %) de 14 cepas analizadas, confirma lo descrito por Bou et al. (2011) quienes afirman que el análisis del gen *gyrB* permite la identificación de especies altamente relacionadas. En el estudio realizado previamente por García et al. (2005), las cepas C-81, C-92, G-171 se identificaron bioquímicamente como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* coincidiendo con la identificación molecular realizada en este trabajo; mientras que las cepas C-50, C-62 y G-189 identificadas previamente como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* fueron identificadas mediante el análisis de la secuencia del gen *gyrB* como *B. thuringiensis* serovar *galleriae* para la cepa C-50 y como *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* para

las cepas C-62 y G-189. Por lo otro lado, algunas cepas que no se lograron identificar previamente con base a su perfil bioquímico, sí se pudieron identificar a nivel de serovar mediante el análisis de la secuencia *gyrB*. Se determinaron como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, las cepas C-9, C-12, G-203; como *B. thuringiensis* serovar *poloniensis*, las cepas G-181, C-245 y C246 y como *B. thuringiensis* serovar *galleriae*, la cepa C-22. Estas reasignaciones de serovar poseen similitud con lo realizado por Branquino et al. (2014) quienes reasignaron cepas de *B. pumilus*, identificadas por métodos bioquímicos, como *B. safensis* y *B. invictae* mediante el análisis del gen *gyrB*. Con respecto a la diversidad de serovares de *B. thuringiensis*, en el Perú Flores et al. (1994) y Chávez et al. (2000) lograron aislar e identificar cepas de *B. thuringiensis* dentro de los serovares *galleriae* y *kurstaki* de acuerdo a las características microscópicas culturales y pruebas bioquímicas diferenciales, sin embargo no se ha reportado ningún trabajo relacionado con la identificación de *B. thuringiensis* a nivel de serovar por comparaciones de las secuencias del gen *gyrB* por lo que este trabajo representa la primera contribución con respecto a este método como una forma de identificación más precisa a comparación de las pruebas bioquímicas.

El árbol filogenético construido mediante el método de reconstrucción filogenética de máxima verosimilitud, reconocido por Swenson et al. (2016) y Bryant et al.(2005) es un método que utiliza con mayor eficiencia la información filogenética contenida en el alineamiento múltiple, permitiendo que con un mismo alineamiento se genere un resultado más cercano a la realidad. Requirió de un modelo de sustitución nucleotídica ya que según lo descrito por Bryant et al. (2005) las posiciones de nucleótidos, aminoácidos, o codones en una secuencia evolucionan de forma independiente y la

sustitución de éstos se modela como un evento aleatorio y continuo a lo largo del tiempo, es por ello que Abascal et al. (2016) recomiendan el uso de modelos de sustitución como descripciones matemáticas de la evolución de las secuencias, las cuales deben cumplir con dos parámetros principales: las probabilidades de cambio entre estados (ya sean nucleótidos, aminoácidos, o codones) y las frecuencias de estos en el alineamiento. La confiabilidad del árbol filogenético estuvo reflejada por valores bootstrap mayores del 50% tal como sugiere Martinez et al. (2007). Los valores por encima del 50% indican medidas confiables y valores de 70% o más indican un soporte óptimo de la información. Se formaron 5 clusters revelados al 95% de identidad de secuencias nucleotídicas (Figura 2). Las 5 cepas identificadas en este trabajo como *B. thuringiensis serovar poloniensis* se agruparon en un solo cluster (II). Además dentro de este grupo las cepas C62 y G181, cuya rama indica un valor bootstrap de 73%, mostraron una relación más cercana a comparación de las otras cepas de su mismo serovar. La cepa sin identificar C257 se posicionó en el cluster (I), no obstante mostró una estrecha relación, soportada con un valor bootstrap de 78%, con el grupo formado por las cepas de *B. thuringiensis serovar poloniensis*. Con esto se puede deducir que si bien la cepa C257 no se identifica como *B. thuringiensis serovar poloniensis* si comparten características comunes. Las cepas identificadas como *B. thuringiensis serovar kurstaki* formaron tres clusters. Las cepas C12 y C181 se agruparon en el cluster III, la cepa C9 se posicionó en el cluster IV y las cepas C92, G171, G203 y el control HD-1 se agruparon en el cluster V. Esta separación de grupos de *B. thuringiensis serovar kurstaki* revela que a pesar de que las cepas pertenecen a un mismo serovar pueden presentar variaciones en su secuencia nucleotídica lo cual posee semejanza con lo desarrollado en el trabajo de Fukushima et al. (2002) donde especies

de *Salmonella entérica* del mismo serovar formaron grupos independientes, así como cepas de *Escherichia coli* pertenecientes a un mismo serogrupo se agruparon en diferentes clusters evidenciando así la transferencia lateral de genes. Dentro del cluster III formado por las cepas de *B. thuringiensis serovar kurstaki* se agruparon también las cepas C22 y C50 identificadas como *B. thuringiensis serovar galleriae* las cuales se muestran altamente relacionadas, hipótesis que se soporta con un valor bootstrap de rama del 99%. Pese a ello, no se puede afirmar que son la misma cepa ya que incluso cepas de diferente especie pueden mostrar ramas con valores bootstrap cercanos al 100%, lo cual sugiere que valores bootstrap altos no pueden ser considerados como indicadores de homología entre especies, simplemente evidencian el grado de relación entre ellas. Esto fue confirmado por Savi et al. (2016) los cuales a partir de una rama originada entre las especies *Microbispora rosea* y *M. indica* con un valor bootstrap de 100% demostraron a través de diferencias en la secuencia de nucleótidos que no podían ser de la misma especie. Asimismo, dentro del cluster III se puede observar que existe una relación (valor bootstrap de 73%) entre los serovares *galleriae* y *kurstaki* resultado que también fue obtenido por Soufiane et al. (2009) cuyo árbol filogenético generado por el alineamiento de genes *gyrB* agrupó a los serotipos *galleriae* y *kurstaki* en un mismo cluster.

Muchos métodos diferentes han sido utilizados para abordar la cuestión de una medida adecuada de similitud, Plewniak (2008) propone la contabilización de la proporción de residuos idénticos en secuencias alineadas en relación con la longitud total de la alineación. De esta forma, se obtuvieron los porcentajes de similitud entre las secuencias nucleotídicas del gen *gyrB* de cepas de *B. thuringiensis* (Tabla 3). Las cepas

de *B. thuringiensis* serovar *galleriae* C22 y C50 mostraron un porcentaje de similitud de secuencias de 55.65%. De acuerdo con Kim et al. (2012) se ha visto que cepas con porcentaje de similitud inferiores al 98,65 % pueden ser consideradas de diferente especie, es por ellos que se sugiere que estas cepas no se pueden tratar de una sola a pesar de compartir el mismo serovar. La cepa C257 mostró porcentajes de similitud de secuencias con las otras cepas por debajo del 83% incluyendo el valor más bajo de porcentaje de similitud de la matriz de identidad (31.65%). Este dato junto con el hecho de que no se encontraron homólogos en la base de datos puede sugerir que se trata de un nuevo serovar. De la misma forma Peeters et al. (2011) concluyó que una cepa de *Flavobacterium* sp. con un bajo grado de similitud de secuencias del gen *gyrB* con en comparación con los valores de similitud más altos obtenidos entre cepas del mismo tipo probablemente representaba la presencia de una nueva especie. En cuanto a los valores de porcentajes de similitud más significativos de las secuencias de *gyrB* de las cepas de *B. thuringiensis* (Tabla 4), éstos variaron entre 31.18% (valor más bajo) y 93.23% (valor más alto), siendo el porcentaje promedio 62.2%. Estos resultados son consistentes con lo reportado por Ozdemir et al. (2019) quienes obtuvieron un porcentaje de similitud de secuencia promedio de 77.5% a nivel de especie asegurando una mayor variabilidad de las secuencias y mayor soporte a la clasificación obtenida. De la misma manera, Mulet et al. (2010) al comparar entre grupos de especies de *Pseudomonas* obtuvo un porcentaje de similitud mínima de 92.9%, lo cual demostraba que la diversidad entre grupos variaba enormemente.

El alto grado de variabilidad entre las cepas de *B. thuringiensis* puede indicar la gran adaptación de esta especie y su relación con *C. incommoda* como su hospedero en

similitud con las observaciones realizadas por Branquino et al. (2014) cuyas cepas de *B. pumilus*, aisladas de gasterópodos mostraron un alto grado de variabilidad (64.8% de similitud) sugiriendo que estas cepas estaban altamente adaptadas a esta clase de moluscos.

CAPÍTULO VI

COMPROBACIÓN DE HIPÓTESIS

6.1. Contrastación de hipótesis general: No aplica.

6.2. Contrastación de hipótesis específicas: No aplica.

CONCLUSIONES

Al finalizar este trabajo de investigación se concluye lo siguiente:

1. Se identificaron a nivel de serovar 13 de las 14 cepas de estudio; las cepas C-9, C-12, C-81, C-92, G-171 y G-203, se identificaron como *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*; las cepas C-62, C-245, C-246, G-181 y G-189, como *B. thuringiensis* serovar *poloniensis* y las cepas C-22 y C-50 como *B. thuringiensis* serovar *galleriae*. No se logró determinar el serovar de la cepa C-257.
2. El árbol filogenético generado a partir de la secuencia del gen *gyrB* mostró las relaciones de parentesco entre las cepas de *B. thuringiensis*. Las cepas de *B. thuringiensis* serovar *poloniensis*, C-62, C-245, C-246, G-181, G-189 formaron un solo cluster (II). Las cepas de *B. thuringiensis* serovar *galleriae* muestran relación con las cepas de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*.
3. La agrupación de las cepas *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* en diferentes clusters sugiere la transferencia lateral del gen *gyrB*.
4. El bajo porcentaje promedio de similitud entre secuencias (62.2%.) demostró la gran variabilidad de las cepas de *B. thuringiensis* y validó la clasificación obtenida.

RECOMENDACIONES

1. Realizar la identificación molecular de la cepa C257 mediante otros genes para confirmar que se trata de un serovar de *B. thuringiensis* aún no descrita e ingresar la secuencia nucleotídica obtenida en este trabajo en la base de datos del Genbank para que sirva de referencia a otros investigadores.
2. Aislar cepas de *B. thuringiensis* de otras zonas de Ica, así como realizar aislamientos provenientes de otras especies de lepidópteros para determinar si existe una variedad más amplia de serovares en la región.

FUENTES DE INFORMACIÓN

1. Sahin B, Gomis-Cebolla J, Günes H, Ferré J. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates by their insecticidal activity and their production of *Cry* and *Vip3* proteins. PLoS One. 2018;13(11):1–18.
2. Federici BA. Overview of the Basic Biology of *Bacillus thuringiensis* with Emphasis on Genetic Engineering of Bacterial Larvicides for Mosquito Control. Open Toxinology J. 2013;3(1):83–100.
3. Lecadet MM, Frachon E, Cosmao Dumanoir V, Ripouteau H, Hamon S, Laurent P, et al. Updating the H-antigen classification of *Bacillus thuringiensis*. J Appl Microbiol. 1999;86(4):660–72.
4. Zenas G, Crickmore N. *Bacillus thuringiensis* applications in agriculture. Sansinenea E, editor. *Bacillus thuringiensis* Biotechnology. Puebla: Springer Dordrecht Heidelberg London New York; 2013. 19–39 p.
5. Sauka DH, Benintende GB. *Bacillus thuringiensis*: Generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev Argent Microbiol. 2008;40(2):124–40.
6. Soufiane B, Côté JC. Discrimination among *Bacillus thuringiensis* H serotypes, serovars and strains based on *16S rRNA*, *gyrB* and *aroE* gene sequence analyses. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2009;95(1):33–45.
7. Grijalba E, Hurst M, Ibarra J, Jurat-Fuentes J, Jackson T. Bacterias entomopatógenas en el control biológico de insectos. In: Cotes AM, editor. Control biológico de fitopatógenos, insectos y ácaros. 1st ed. Mosquera:

AGROSAVIA; 2018. p. 372–401.

8. Mahbub NS and KR. *Bacillus thuringiensis*: An Environment Friendly Microbial Control Agent. Acad Journals Inc. 2012;2(2):36–51.
9. Bou G, Fernández-Olmos A, García C, Sáez-Nieto JA, Valdezate S. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. Enferm Infecc Microbiol Clin. 2011;29(8):601–8.
10. Wei S, Chelliah R, Park BJ, Park JH, Forghani F, Park YS, et al. Molecular discrimination of *Bacillus cereus* group species in foods (lettuce, spinach, and kimba) using quantitative real-time PCR targeting *groEL* and *gyrB*. Microb Pathog [Internet]. 2018;115:312–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.12.079>
11. Madrigal-Valverde KA. Uso de herramientas para alineación de secuencias y creación de árboles filogenéticos para la determinación de especies. Rev Tecnol en Marcha. 2017;30(5):30.
12. Peña C. Métodos de inferencia filogenética. Rev Peru Biol. 2011;18(2):265–7.
13. Bos DH, Posada D. Using models of nucleotide evolution to build phylogenetic trees. Dev Comp Immunol. 2005;29(3):211–27.
14. Dunbar J, Ticknor LO, Kuske CR. Assessment of microbial diversity in four Southwestern United States soils by 16S rRNA gene terminal restriction fragment analysis. Appl Environ Microbiol. 2000;66(7):2943–50.
15. Saleena LM, Rangarajan S, Nair S. Diversity of *Azospirillum* strains isolated from rice plants grown in saline and nonsaline sites of coastal agricultural ecosystem.

- Microb Ecol. 2002;44(3):271–7.
16. Martínez-Romero E, Caballero-Mellado J. Rhizobium Phylogenies and Bacterial Genetic Diversity . CRC Crit Rev Plant Sci. 1996;15(2):113–40.
 17. Fukushima M, Kakinuma K, Kawaguchi R. Strains on the Basis of the *gyrB* Gene Sequence. 2002;40(8):2779–85.
 18. Kirby BM, Everest GJ, Meyers PR. Phylogenetic analysis of the genus *Kribbella* based on the *gyrB* gene: Proposal of a *gyrB*-sequence threshold for species delineation in the genus *Kribbella*. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2010;97(2):131–42.
 19. Mulet M, Lalucat J, García-Valdés E. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. Environ Microbiol. 2010;12(6):1513–30.
 20. Peeters K, Willems A. The *gyrB* gene is a useful phylogenetic marker for exploring the diversity of *Flavobacterium* strains isolated from terrestrial and aquatic habitats in Antarctica. FEMS Microbiol Lett. 2011;321(2):130–40.
 21. Huang CH, Chang MT, Huang L, Chu WS. The *gyrase B* gene as a molecular marker to resolve interspecific relationships within the *Acetobacter pasteurianus* group and a novel target for species-specific PCR. Eur Food Res Technol. 2014;238(1):27–33.
 22. Vidal-Quist JC, Rogers HJ, Mahenthiralingam E, Berry C. *Bacillus thuringiensis* colonises plant roots in a phylogeny-dependent manner. FEMS Microbiol Ecol. 2013;86(3):474–89.
 23. Branquinho R, Meirinhos-Soares L, Carriço JA, Pintado M, Peixe L V.

- Phylogenetic and clonality analysis of *Bacillus pumilus* isolates uncovered a highly heterogeneous population of different closely related species and clones. FEMS Microbiol Ecol. 2014;90(3):689–98.
24. Carrasco G, Valdezate S, Garrido N, Medina-Pascual MJ, Villalón P, Sáez-Nieto JA. *GyrB* analysis as a tool for identifying *Nocardia* species and exploring their phylogeny. J Clin Microbiol. 2015;53(3):997–1001.
25. Galloway-Peña J, Sahasrabhojane P, Tarrand J, Han XY, Shelburne SA. *GyrB* polymorphisms accurately assign invasive viridans group streptococcal species. J Clin Microbiol. 2014;52(8):2905–12.
26. Savi DC, Aluizio R, Galli-Terasawa L, Kava V, Glienke C. *16S-gyrB-rpoB* multilocus sequence analysis for species identification in the genus *Microbispora*. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2016;109(6):801–15.
27. Ahmadi S, Harighi B, Abdollahzadeh J. Phylogenetic relationships of fluorescent *Pseudomonad* isolates associated with bacterial canker of stone fruit trees in Kurdistan province, Iran. Eur J Plant Pathol. 2018;150(3):679–89.
28. Bunpa S, Nishibuchi M, Thawonsuwan J, Sermwittayawong N. Genetic heterogeneity among *Vibrio alginolyticus* strains, and design of a PCR-based identification method using *gyrB* gene sequence. Can J Microbiol. 2018;64(1):1–10.
29. Özdemir F, Arslan S. Molecular Characterization and Toxin Profiles of *Bacillus* spp. Isolated from Retail Fish and Ground Beef. J Food Sci. 2019;84(3):548–56.
30. Nixon KC. Phylogeny. Encycl Biodivers Second Ed. 2001;4:16–23.

31. Charleston M. Phylogeny. Brenner's Encycl Genet Second Ed. 2013;3:324–5.
32. Helmus MR, Bland TJ, Williams CK, Ives AR. Phylogenetic measures of biodiversity. Am Nat. 2007;169(3).
33. Nayar NM. Phylogeny. In: The coconut: Phylogeny, origins and spread. Elsevier; 2017. p. 67–92.
34. Sellarés MF. Estudio de la Estructura Genética de Poblaciones de *Vibrio cholerae*. Universidad de Barcelona; 2002.
35. Kuwana R, Imamura D, Takamatsu H, Watabe K. Discrimination of the *Bacillus cereus* group members by pattern analysis of random amplified polymorphic DNA-PCR. Vol. 17, Biocontrol Science. 2012. p. 83–6.
36. Galvis F, Yolima Moreno L. Caracterización molecular mediante rep-PCR de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis*, obtenidos de muestras de suelo. Agron Costarric. 1969;38(1):223–9.
37. Huerta D, Acosta O, Chang M. Diversidad genético molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* con potencial tóxico contra *Aedes aegypti*. An la Fac Med. 2012;73(3):205.
38. Le Roux F, Gay M, Lambert C, Nicolas JL, Gouy M, Berthe F. Phylogenetic study and identification of *Vibrio splendidus*-related strains based on *gyrB* gene sequences. Dis Aquat Organ. 2004;58(2–3):143–50.
39. Everest GJ, Meyers PR. The use of *gyrB* sequence analysis in the phylogeny of the genus *Amycolatopsis*. Antonie van Leeuwenhoek, Int J Gen Mol Microbiol. 2009;95(1):1–11.

40. Martínez MC, Helguera M, Carrera A. Marcadores moleculares. In: Levitus G, Echenique V, Rubinstein C, Hopp E, Mroginski L, editors. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. 1st ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2017. p. 73.
41. Rodicio M del R, Mendoza M del C. Identificación bacteriana mediante secuenciación del *ARNr 16S*: fundamento, metodología y aplicaciones en microbiología clínica. *Enferm Infecc Microbiol Clin* [Internet]. 2004;22(4):238–45. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X\(04\)73073-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0213-005X(04)73073-6)
42. Da Mota FF, Gomes EA, Paiva E, Rosado AS, Seldin L. Use of *rpoB* gene analysis for identification of nitrogen-fixing *Paenibacillus* species as an alternative to the *16S rRNA* gene. *Lett Appl Microbiol*. 2004;39(1):34–40.
43. Drevinek P, Baldwin A, Dowson CG, Mahenthiralingam E. Diversity of the *parB* and *repA* genes of the *Burkholderia cepacia* complex and their utility for rapid identification of *Burkholderia cenocepacia*. *BMC Microbiol*. 2008;8:1–10.
44. Yáñez MA, Catalán V, Apráiz D, Figueras MJ, Martínez-Murcia AJ. Phylogenetic analysis of members of the genus *Aeromonas* based on *gyrB* gene sequences. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53(3):875–83.
45. Malats N, Calafell F. Basic glossary on genetic epidemiology N Malats, F Calafell. *J Epidemiol Community Heal* [Internet]. 2003;57:480–2. Available from: www.jech.com
46. Palomino-Camargo C, González-Muñoz Y. Técnicas moleculares para la detección e identificación de patógenos en alimentos: ventajas y limitaciones. *Rev Peru Med Exp Salud Publica*. 2014;31(3):535–46.

47. American Heritage Dictionary. The American Heritage Medical Dictionary. 4th ed. Boston: Houghton Mifflin Co.; 2007.
48. Wagenaar DJ, Weissleder R, Hengerer A, Base S. in Medicine Glossary of Molecular Imaging Terminology 1 TERMINOLOGY. Acad Radiol. 2001;8(5):409–20.
49. Ong HS. Comparative genomics analysis. Encycl Bioinforma Comput Biol ABC Bioinforma. 2018;1–3(August 2017):425–31.
50. Pérez L. Variabilidad genética de cepas nativas de *Azospirillum brasilense* mediante análisis tipo PCR-RFLP del *DNA 16S* ribosomal. Instituto Politécnico Nacional; 2005.
51. Padilla C, Diez J, Martínez E, Bárcena J, García C. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de DNA plasmídico. Dep Bioquímica y Biol Mol. 2011;1–8.
52. Abascal F, Irisarri I, Zardoya R. Filogenia y evolución molecular. In: Pascual-García ÁS y A, editor. Bioinformática con Ñ. 1st ed. 2016. p. 231–59.
53. Duchen P. Métodos de reconstrucción Filogenética I: máxima verosimilitud. Tequio. 2021;4(11):69–79.
54. Ajawatanawong P. Molecular Phylogenteics: Concept for a Newcomer. Adv Biochem Eng Biotechnol. 2016;123(October 2016).
55. Martínez-Castilla, León P. Reconstrucción de la historia de cambio de los caracteres. In: Lalli R, editor. Ecología Molecular. 1st ed. México D.F.: Instituto Nacional de Ecología; 2007. p. 592.

56. Pearson WR. BLAST and Fasta Similarity Searching for Multiple Sequence Alignment. In: Russell DJ, editor. Multiple Sequence Alignment Methods. 1st ed. New Jersey: Humana Press; 2014. p. 75–101.
57. Hall BG. Phylogenetic Trees Made Easy. 5th ed. New York: Oxford University Press; 2018.
58. Plewniak F. Database Similarity Searches. In: Thompson JD, Schaeffer-Reiss C, Ueffing M, editors. Functional Proteomics: Methods and Protocols. 1st ed. New Jersey: Humana Press; 2008. p. 361–78.
59. Travers RS, Martin PAW, Reichelderfer CF. Selective Process for Efficient Isolation of Soil *Bacillus spp.* Appl Environ Microbiol. 1987;53(6):1263–6.
60. Madigan MT. Brock Biología de los microorganismos. 12ava ed. Madrid: Pearson Addison Wesley; 2009.
61. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. J Mol Biol. 1990;215(3):403–10.
62. Holder M, Lewis PO. Phylogeny estimation: Traditional and Bayesian approaches. Nat Rev Genet. 2003;4(4):275–84.
63. Posada D, Crandall KA. Selecting the Best-Fit Model of Nucleotide Substitution. Syst Biol. 2001;50(4):580–601.
64. Posada D. Using MODELTEST and PAUP * to Select a Model of Nucleotide Substitution . Curr Protoc Bioinforma. 2003;00(1):1–14.
65. García García E, Quispe Felices F. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas de *Copitarsia incommoda* colectadas

en campos de *Asparagus officinalis* (“Esparrago”) de la provincia de Ica. San Luis Gonzaga; 2005.

66. Flores A, Egusquiza R, Vilcapoma A, LEÓN J. Distribución geográfica de *Bacillus thuringiensis* con potencial entomopatógeno. In: IV Reunión Científica del Instituto de Ciencias Biológicas “Antonio Raimondi” Fac Ciencias UNMSM Lima - Perú. Lima; 1994.
67. Chávez J, Pardo H. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en el valle de Ica. Universidad Nacional San Luis Gonzaga; 2000.
68. Swenson KM, Simonaitis P, Blanchette M. Models and algorithms for genome rearrangement with positional constraints. *Algorithms Mol Biol.* 2016;11(1):1–10.
69. Bryant D, Galtier N, Poursat M-A. Likelihood calculation in molecular phylogenetics. *Math Evol Phylogeny* [Internet]. 2005;33–62. Available from: http://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=VjA8ThtLs7IC&oi=fnd&pg=PA33&dq=Likelihood+calculation+in+molecular+phylogenetics&ots=YqS6_OiCOv&sig=1YR4WtsmGYsSGVgXWFlGIkmkjJ8
70. Kim OS, Cho YJ, Lee K, Yoon SH, Kim M, Na H, et al. Introducing EzTaxon-e: A prokaryotic 16s rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2012;62(PART 3):716–21.

ANEXOS

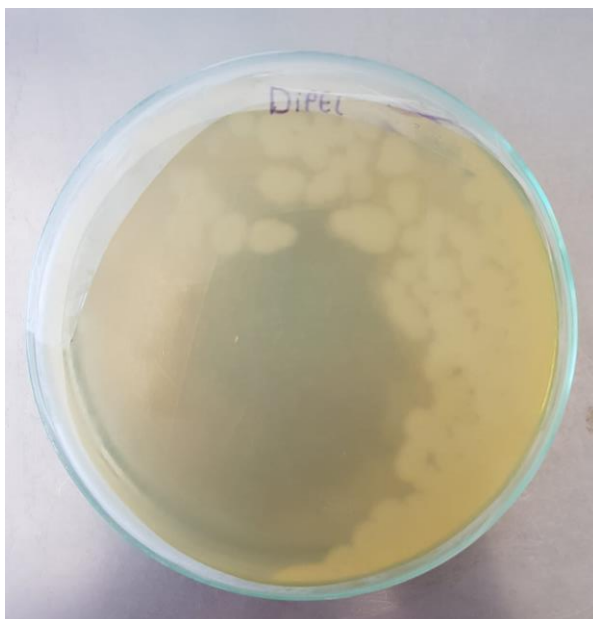


Figura 3. Cepa HD-1 reactivada. Se observan características típicas de colonia de *Bacillus thuringiensis*.

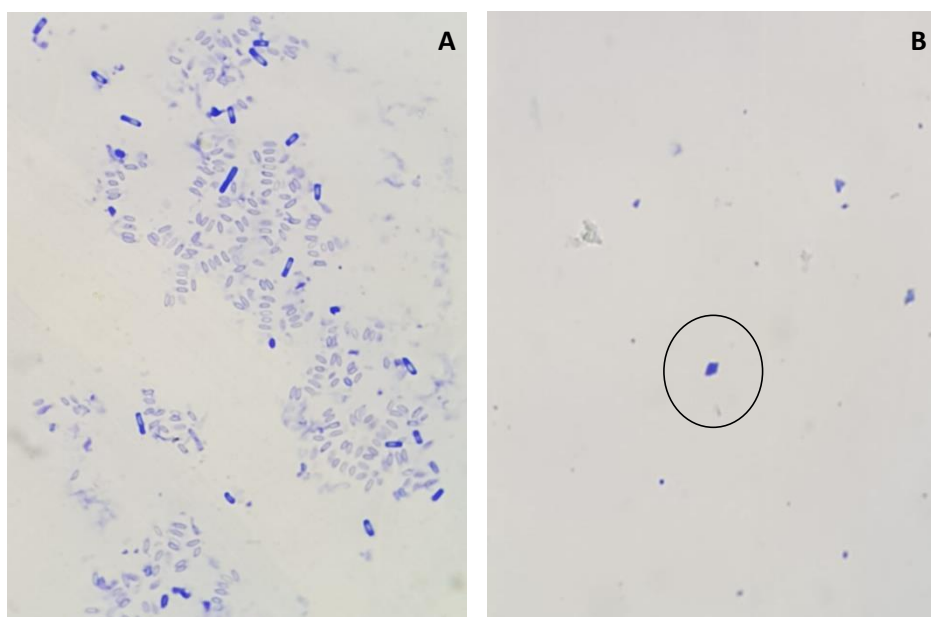


Figura 4. Vista microscópica (1000X) de *B. thuringiensis*. A.- células y esporas, B.- cristal proteínico.

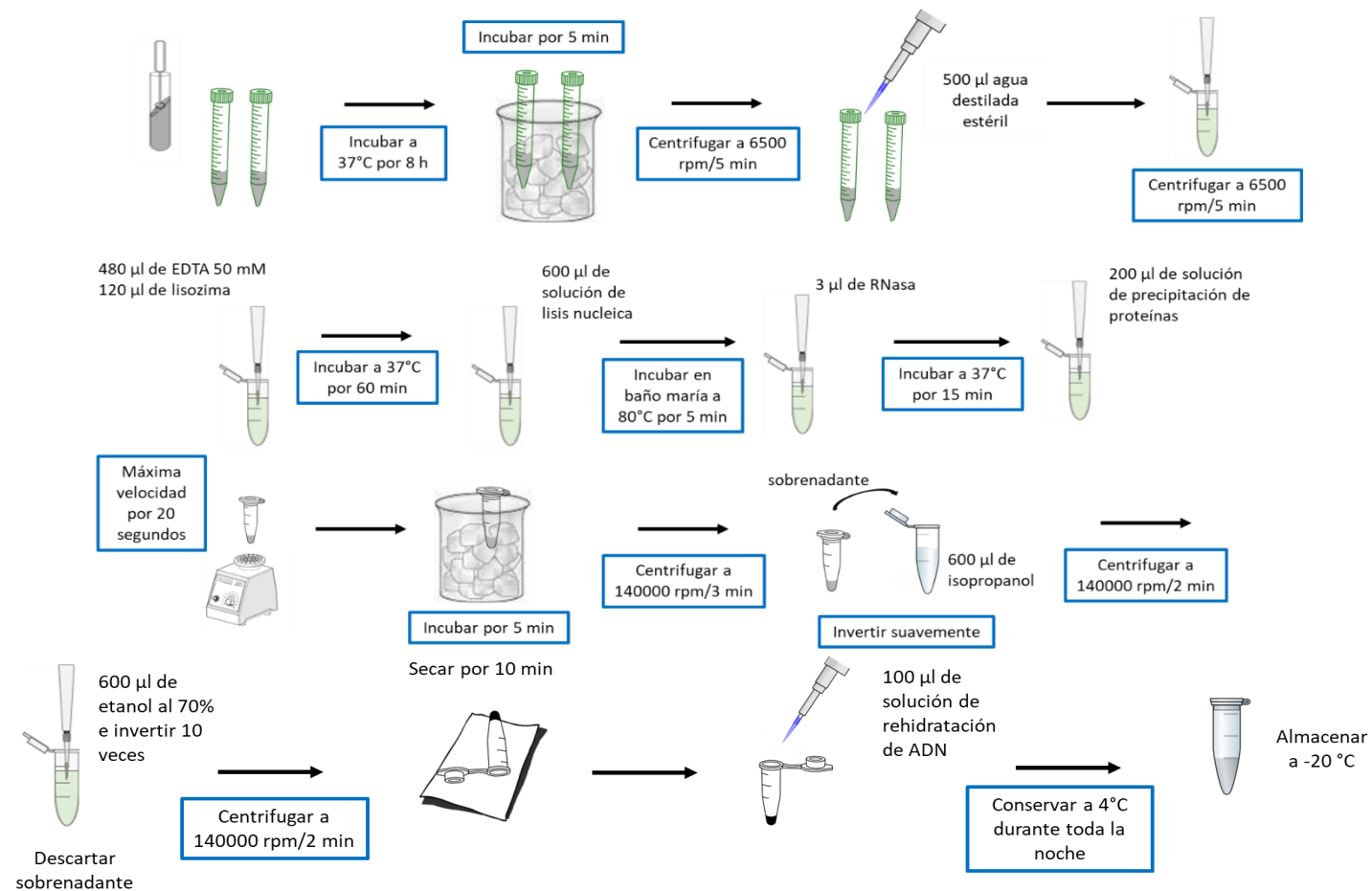


Figura 5. Flujograma del protocolo de extracción de ADN genómico de *B. thuringiensis* usando el kit de purificación de ADN Wizard® Genomic (Promega®)



Figura 6: Kit de purificación de ADN Wizard® Genomic (Promega®)

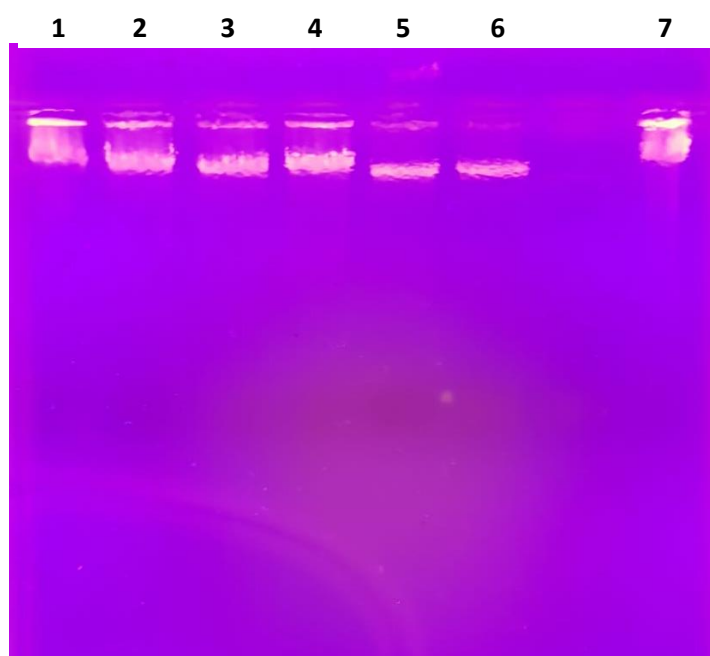


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa 1% con bandas de ADN de las cepas de *Bacillus thuringiensis*. Carriles: 1, cepa G-181; 2, cepa G-189; 3, cepa G-203; 4, cepa C-245; 5, cepa C-246; 6, cepa C-257; 7, cepa HD-1.

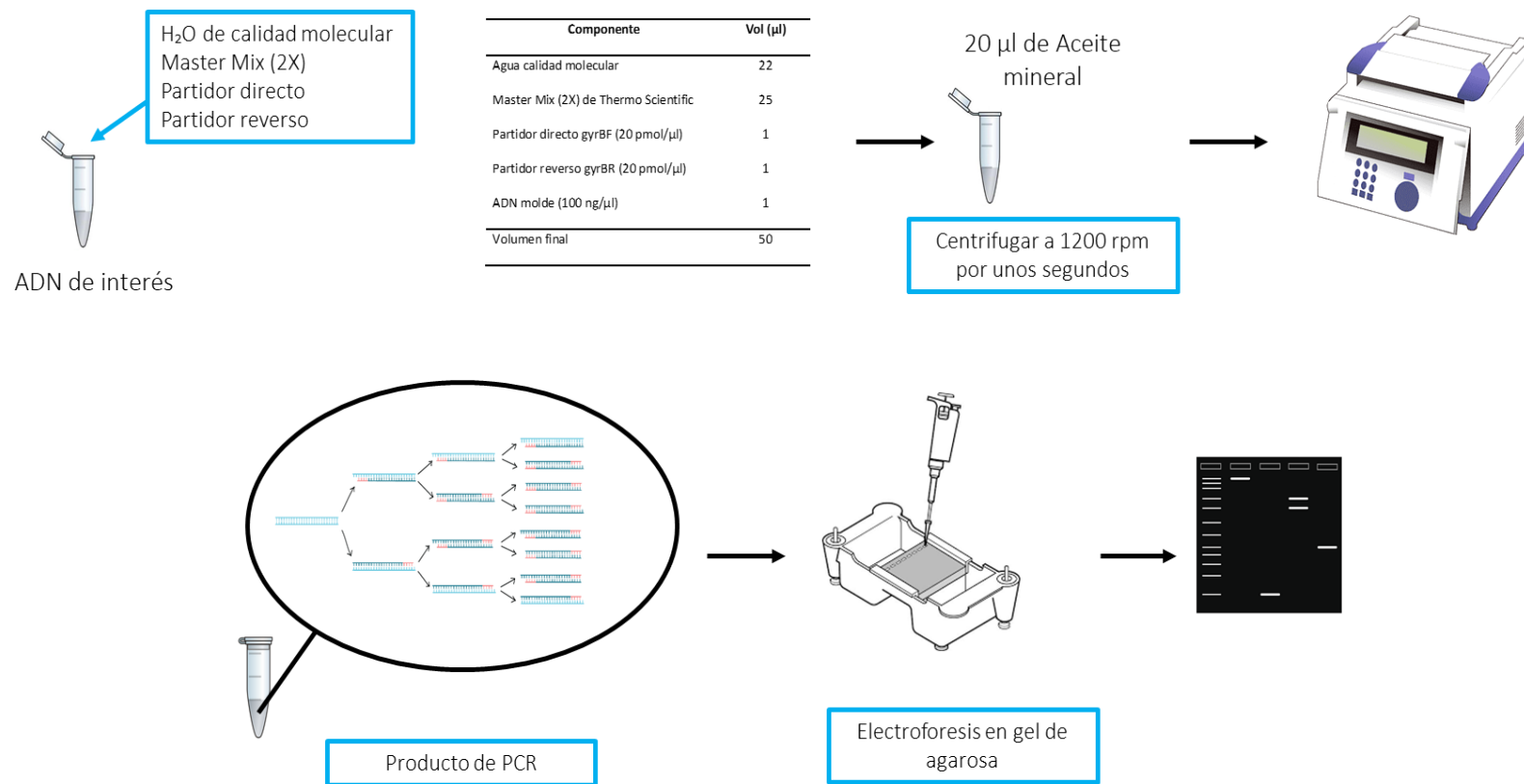


Figura 6. Flujograma del protocolo de amplificación mediante PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

Figura 7: Interfaz del algoritmo BLASTn en la página web de National Center for Biotechnology Information (NCBI).

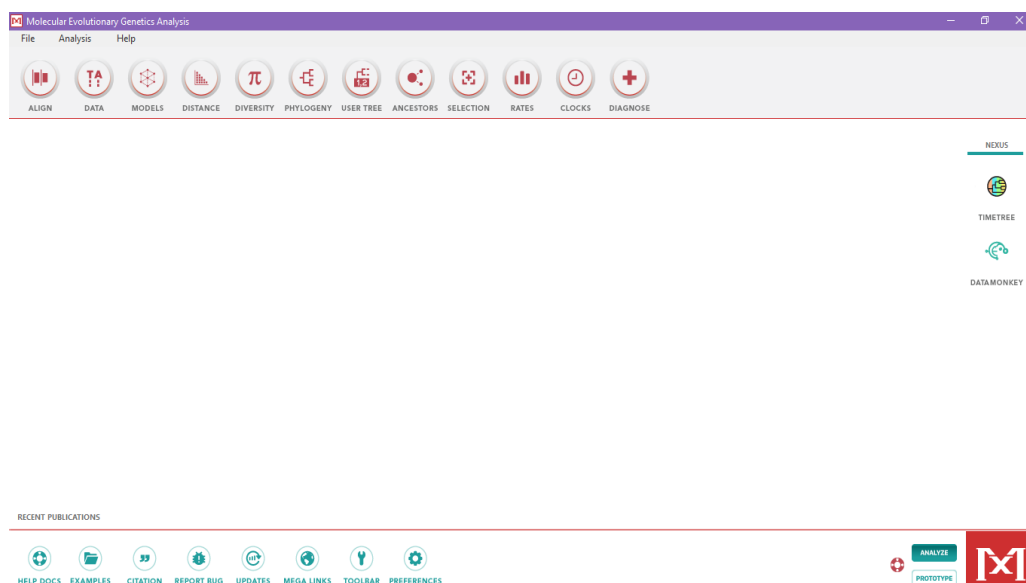


Figura 8: Interfaz del programa MEGA-X.

MX: Analysis Preferences

Phylogeny Reconstruction

Option	Setting
ANALYSIS	
Statistical Method →	Maximum Likelihood
PHYLOGENY TEST	
Test of Phylogeny →	Bootstrap method
No. of Bootstrap Replications →	1000
SUBSTITUTION MODEL	
Substitutions Type →	Nucleotide
Model/Method →	General Time Reversible model
RATES AND PATTERNS	
Rates among Sites →	Uniform Rates
No of Discrete Gamma Categories →	Not Applicable
DATA SUBSET TO USE	
Gaps/Missing Data Treatment →	Partial deletion
Site Coverage Cutoff (%) →	95
TREE INFERENCE OPTIONS	
ML Heuristic Method →	Subtree-Pruning-Regrafting - Extensive (SPR level 5)
Initial Tree for ML →	Make initial tree automatically (Default - NJ/BioNJ)
Initial Tree File →	Not Applicable
Branch Swap Filter →	None
SYSTEM RESOURCE USAGE	
Number of Threads →	3

Help Cancel OK

Figura 9. Ventana de preferencias de la opción de construcción de árboles filogenéticos de “Máximo Likelihood” o máxima verosimilitud (MEGA-X).

PAUP* 4.0a169 - [Output Display]

File Edit Options Data Analysis Trees Window Help

Model selection results for AICc:

#	Model	-lnL	K	AICc	delta AICc	AICc weight	cumul weight
55	GTR+G	7527.28	36	15128.64	0.00	0.6334	0.6334
56	GTR+I+G	7527.28	37	15130.76	2.12	0.2198	0.8532
23	TI+H+G	7532.79	33	15133.32	4.67	0.0612	0.9143
39	TI+H+G	7531.98	34	15133.82	5.18	0.0476	0.9619
24	TrN+I+G	7532.79	34	15135.43	6.78	0.0213	0.9833
40	TI+I+G	7531.98	35	15135.93	7.29	0.0166	0.9998
47	TV+H+G	7537.25	35	15146.47	17.83	8.53e-005	0.9999
48	TV+H+I+G	7537.25	36	15148.58	19.94	2.96e-005	1.0000
15	HKY+G	7542.05	32	15149.74	21.09	1.66e-005	1.0000
31	KBI+I+G	7541.19	33	15150.13	21.49	1.37e-005	1.0000
16	HKY+I+G	7542.05	33	15151.64	23.20	5.81e-006	1.0000
32	KBI+I+I+G	7541.19	34	15152.24	23.60	4.76e-006	1.0000
7	F81+G	7545.76	31	15155.06	26.41	1.17e-006	1.0000
8	F81+I+G	7545.76	32	15157.16	28.51	4.08e-007	1.0000
51	SVH+G	7572.75	33	15213.24	84.59	2.71e-019	1.0000
52	SVH+I+G	7572.75	34	15215.34	86.70	9.44e-020	1.0000
19	TrNef+G	7578.63	30	15218.70	90.06	1.76e-020	1.0000
35	TI+Hef+G	7578.60	31	15220.75	92.10	6.33e-021	1.0000
20	TrNef+I+G	7578.63	31	15220.80	92.15	6.18e-021	1.0000
36	TI+Hef+I+G	7578.60	32	15222.85	94.20	2.22e-021	1.0000
54	GTR+I	7577.88	36	15229.84	101.19	6.73e-023	1.0000
22	TrN+I	7583.31	33	15234.36	105.72	7.01e-024	1.0000
38	TI+H+I	7582.56	34	15234.96	106.32	5.19e-024	1.0000
43	TVNef+G	7585.75	32	15237.14	108.50	1.75e-024	1.0000
46	TVH+I	7582.88	35	15237.73	109.08	1.30e-024	1.0000
44	TVNef+I+G	7585.75	33	15239.24	110.60	6.10e-025	1.0000
14	HKY+I	7587.72	32	15241.80	112.44	2.43e-025	1.0000
30	KBI+I+I	7586.97	33	15241.69	113.05	1.79e-025	1.0000
11	K80+G	7592.10	29	15243.56	114.91	7.05e-026	1.0000
3	JC+G	7593.55	28	15244.35	115.71	4.74e-026	1.0000
27	KBI+G	7592.88	30	15245.61	116.97	2.53e-026	1.0000
12	K80+I+G	7592.10	30	15245.65	117.01	2.40e-026	1.0000
4	JC+I+G	7593.55	29	15246.44	117.80	1.67e-026	1.0000
6	F81+I	7591.61	31	15246.77	118.12	1.42e-026	1.0000
28	KBI+I+G	7592.88	31	15247.71	119.06	8.85e-027	1.0000
53	GTR	7609.98	35	15291.93	163.29	2.21e-036	1.0000
21	TrN	7614.85	32	15295.34	166.69	4.02e-037	1.0000

Activar Windows

Ve a Configuración para activar Windows

Ejecutar Cerrar Detener

Figura 10: Interfaz del programa PAUP4 mostrando los cálculos para valores AICC.

The screenshot displays the Clustal Omega web interface. At the top is a navigation bar with links for EMBL-EBI, Services, Research, Training, Industry, and About us. Below this is a teal header with the 'Clustal Omega' logo and a navigation menu including 'Input form', 'Web services', 'Help & Documentation', and 'Bioinformatics Tools FAQ'. The main content area is titled 'Multiple Sequence Alignment' and includes a brief description of the tool and an 'Important note' about sequence limits. The interface is divided into three steps: Step 1 'Enter your input sequences' with a dropdown for 'DNA' and a large text area for sequences; Step 2 'Set your parameters' with a dropdown for 'ClustalW with character counts' and a 'More options...' link; and Step 3 'Submit your job' with a checkbox for email notifications and a 'Submit' button.

EMBL-EBI Services Research Training Industry About us

EMBL-EBI Hinxton

Clustal Omega

Input form Web services Help & Documentation Bioinformatics Tools FAQ

Tools > Multiple Sequence Alignment > Clustal Omega

Multiple Sequence Alignment

Clustal Omega is a new multiple sequence alignment program that uses seeded guide trees and HMM profile-profile techniques to generate alignments between **three or more** sequences. For the alignment of two sequences please instead use our pairwise sequence alignment tools.

Important note: This tool can align up to 4000 sequences or a maximum file size of 4 MB.

STEP 1 - Enter your input sequences

Enter or paste a set of

DNA

sequences in any supported format:

Or, upload a file: [Seleccionar archivo](#) Ningún archivo seleccionado [Use a example sequence](#) [Clear sequence](#) [See more example inputs](#)

STEP 2 - Set your parameters

OUTPUT FORMAT

ClustalW with character counts

The default settings will fulfill the needs of most users.

[More options...](#) [\(Click here, if you want to view or change the default settings.\)](#)

STEP 3 - Submit your job

☐ Be notified by email (Tick this box if you want to be notified by email when the results are available)

[Submit](#)

Figura 7: Interfaz del programa online Clustal Omega en la página web de The European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI).