



DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN ESPECÍFICA DE *Bacillus sp 83* POR PCR

Karina Alejandra Balderas Ruíz, Noemí Flores, Celia Flores, Enrique Galindo y Leobardo Serrano-Carreón.
Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México. Apdo. Post. 510-3, Cuernavaca, Morelos. C. P. 62210 México. karina@ibt.unam.mx

Palabras clave: *Bacillus sp 83*, control biológico, qPCR.

Introducción. Recientemente se ha propuesto el uso de los métodos basados en la PCR en tiempo real (qPCR), para el seguimiento de la dinámica de población (colonización) de los agentes de control biológico (ACB), siendo una herramienta importante para entender la eficacia de los ACB en el control de enfermedades de cultivos agrícolas. La bacteria *Bacillus sp 83* fue aislada del follaje de mango y seleccionada como ACB contra *Colletotrichum gloeosporioides*. Actualmente en México se comercializa un fungicida a base de *Bacillus sp 83* para el control de antracnosis en mango y en otros cultivos. El producto es eficaz en aplicaciones mensuales a dosis de 2 g/L (2×10^9 UFC/L) sobre el follaje del árbol de mango desde el inicio de la floración y hasta la cosecha del fruto [1]. Sin embargo, se desconoce la dinámica de la población de *Bacillus sp 83* cuando es aplicada en partes foliares. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de detección y cuantificación específica de *Bacillus sp 83* aplicado en follaje, mediante una técnica de qPCR para realizar el seguimiento de la población de este ACB.

Metodología. Para obtener el ADN de la bacteria se llevaron a cabo cultivos de *Bacillus sp 83* en matraces con medio líquido YPG, incubados a 29°C y 200 rpm durante una noche. Se diseñaron los oligonucleótidos para la amplificación del ADN de *Bacillus sp 83* con el software *Primer Express* versión 2.0. Para lo anterior se partió de la secuencia altamente específica en la región del gen *yomR* de este ACB, previamente reportada. A través de la qPCR se obtuvieron dos curvas estándar: 1) a partir de diluciones seriadas de ADN en el rango de 600 a 0.0006 ng y 2) a partir de suspensiones celulares con 1×10^9 a 1×10^2 UFC/mL. Para la curva 1 se determinó la concentración de ADN con un equipo *Nanodrop*. Para la curva 2 se determinaron las UFC/mL con el método de cuenta en placa. La extracción del ADN de la bacteria se llevó a cabo por la técnica de Cloroformo-Fenol. Para la reacción se utilizó *SYBR Green I*, y se incluyó en el método la curva de desnaturalización para evaluar la formación de subproductos en la reacción.

Resultados y Discusión. El rango lineal de trabajo estuvo entre 60 a 0.0006 ng de ADN de *Bacillus sp 83*, con una eficiencia de amplificación ($E=10^{-1/\text{pendiente}}-1$) de los oligonucleótidos del 97.7% (Fig. 1a). La curva de desnaturalización no mostró la generación de subproductos en la reacción. Por otra parte, el rango

lineal de trabajo estuvo entre 3.5×10^2 y 4.8×10^7 UFC/mL con $E=99.8\%$ (Fig. 1b). Con ambas curvas se determinó que 130 fg de ADN de *Bacillus sp 83* corresponden con el límite mínimo de detección (LMD) de 3.5×10^2 UFC/mL, lo cual nos indica la alta sensibilidad del método de cuantificación. Otros autores han reportado un LMD de 50 fg ADN de otras cepas de *Bacillus*; sin embargo no lo relacionan con el número de células viables, con lo cual la población de los agentes de control biológico puede ser sobrestimado, ya que se cuantifica ADN total (de células viables y muertas).

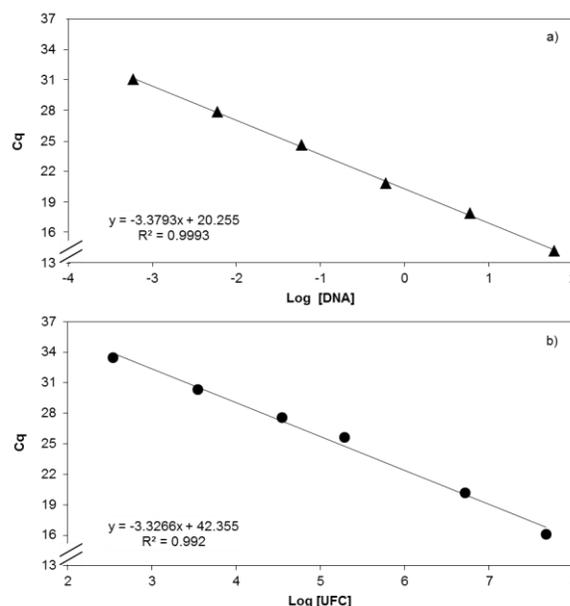


Fig. 1. Curvas estándar de amplificación del ADN de *Bacillus sp 83*. a) con ADN seriamente diluido y b) con suspensiones celulares. Cq: ciclo de amplificación. El Cq de muestras sin ADN fue de 37.

Conclusiones. La sensibilidad de este método permitirá cuantificar la población de *Bacillus sp 83* en los rangos esperados (entre 10^4 y 10^5 UFC/mL) en el follaje de mango.

Agradecimiento. Beca CONACyT 361862; proyecto DGAPA (IN IN206715).

Bibliografía.

1 Galindo, E., Serrano-Carreón, L., Gutiérrez, C., Allende, R., Balderas, K., Patiño, M., Trejo, M., Wong, M., Rayo, E., Isauro, D. and Jurado, C. *Electronic Journal of Biotechnology* [online]. 14 May 2013, vol. 16, no. 3 [cited May 24, 2013].