

Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de carpocapsa

Isolation and characterization of new *Bacillus thuringiensis* isolates from live and healthy larvae of carpocapsa

Diego Sauka^{1,2*}, María Inés Onco^{1,2}, Melisa Pérez^{1,2}, Nanci López¹ y Graciela Benintende¹

¹Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA). ²Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

*sauka.diego@inta.gob.ar

Bacillus thuringiensis es la bacteria entomopatógena más estudiada y utilizada en el mundo como agente de control microbiano. Se caracteriza por sintetizar factores de virulencia que se conglomeran en inclusiones cristalinas parasporales (proteínas Cry/Cyt) durante la fase de esporulación. Asimismo, puede secretar metabolitos insecticidas durante su fase vegetativa de crecimiento, los que son activos *per se* o pueden contribuir sinérgicamente a la toxicidad global de la cepa en estudio.

Durante los últimos años, se han establecido en distintas partes del mundo colecciones de *B. thuringiensis* con la finalidad de encontrar nuevas cepas productoras de factores de virulencia que posean mayor poder insecticida o tóxicas para insectos en los que no se ha reportado actividad. Esta bacteria se ha aislado a partir de muestras de suelos, filoplano de plantas, residuos de la molienda de granos, telarañas, e incluso larvas de insectos muertos o enfermos. Sin embargo, el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas ha sido muy poco explorado. En el presente estudio se describe el aislamiento y caracterización fenotípica y genotípica de nuevos aislados de *B. thuringiensis* obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de la comúnmente conocida carpocapsa o polilla del manzano (*Cydia pomonella* L. [Lepidoptera: Tortricidae]).

Se realizaron aislamientos a partir de 32 larvas vivas y sanas provenientes de distintas fincas radicadas en Tunuyán (Mendoza) y en el Alto Valle (Río Negro), libres de la aplicación de *B. thuringiensis*. A partir de tres de ellas, se obtuvieron 8 aislamientos que fueron identificados por la presencia de cristales parasporales y análisis de un fragmento del gen 16S rRNA, dejando claro que el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de este tipo de muestras es totalmente factible. Se individualizaron cristales ovoides mediante microscopía de contraste de fases en todos ellos. Su análisis mediante SDS-PAGE brindó la existencia de una banda principal de ca. 130 kDa en la mayoría de estos, mientras que en otros, de ca. 180 kDa. Posteriormente se procedió a la detección de genes que codifican proteínas tóxicas para

lepidópteros, coleópteros y dípteros, y de genes asociados a la síntesis de β -exotoxina y zwittermicina, mediante amplificación génica (PCR). Se obtuvo ausencia de amplificaciones para los genes estudiados en todos los aislamientos, con excepción de la detección de genes *cry8* en todos los aislamientos de la muestra L276. Paralelamente, los nuevos aislamientos se analizaron mediante Rep-PCR; lo que permitió que estos se agruparan dentro de uno de dos perfiles electroforéticos distintivos. Se evidenciaron 18 bandas polimórficas en ellos. El perfil de uno de estos grupos se asemejó al de la cepa coleopterica DSM2803 utilizada como referencia.

Finalmente se evaluó la patogenicidad de los nuevos aislamientos utilizando larvas de lepidópteros (*C. pomonella*), coleópteros (*Alphitobius diaperinus*) y dípteros (*Aedes aegypti*). Ninguno de los aislamientos nativos resultó significativamente tóxico para *C. pomonella* ni *A. diaperinus*. Mostraron un nivel de actividad insecticida nulo a leve, reportando mortalidades comprendidas entre el 0,0 % y el 10,4 % para *C. pomonella* y entre el 2,1 % y el 12,5 % para *A. diaperinus*. Estos niveles de toxicidad para *C. pomonella* eran esperables, ya que los aislamientos provinieron de larvas vivas y sanas de la misma especie donde se evaluó su patogenicidad. Por una parte, se podría hipotetizar que estos *B. thuringiensis* se encontraban en las larvas de donde se aislaron como saprófitos, y llegaron a ellas por estar en contacto con sus esporas libres o contenidas en su alimento habitual. En cambio, la baja toxicidad obtenida para *A. diaperinus* se pudo correlacionar con los aislamientos obtenidos de la muestra L276 con la presencia de un cristal ovoide asociado a una proteína de ca. 130 kDa, genes *cry8* y un perfil de Rep-PCR similar al de una cepa coleopterica. Por otra parte, ninguno de los aislamientos tampoco produjo mortalidad, ni ningún efecto visible, en larvas de *A. aegypti*. Teniendo en cuenta que en los aislamientos no se detectaron genes de toxinas insecticidas asociadas con actividad dipterica, era de esperar que estos no sean activos. Las proteínas Cry8 se han reportado como tóxicas para coleópteros, por ejemplo, para *Anthonomus grandis*, y en particular, para ciertos miembros de la familia Scarabaeidae, y para algunos lepidópteros como *Anticarsia gemmatilis*. Por lo tanto, los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10, INTA L276-11 podrían ser tóxicos para otras especies de coleópteros que no han sido aún evaluadas (por ejemplo, especies de escarabeídos). No obstante, para descartar o confirmar una actividad insecticida importante por parte de estos aislamientos nativos nuevos sería necesario realizar nuevos bioensayos donde se enfrenten estos y larvas de insectos pertenecientes a otras especies de los órdenes estudiados, incluso larvas de otros Filo como el Nematoda.

Publicaciones

- Sauka, D.; Pérez, M.; Lopez, N.; Onco, M.; Berretta, M.; Benintende, G. 2014. G. PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. *Journal of Invertebrate Pathology* 122: 28-31.
- Onco, M. 2018. Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica. Tesis Doctoral, Facultad de Agronomía, UBA.
- Sauka, D.; Onco, M.; Pérez, M.; López, N.; Berretta, M.; Benintende, G. 2014. Rápida predicción de la producción de β -exotoxina de tipo I en *Bacillus thuringiensis* mediante amplificación génica. XV Jornadas Argentinas de Microbiología. Córdoba.
- Sauka, D.; López, N.; Berretta, M.; Benintende, G. 2015. Predicción de la producción de zwittermicina A en *Bacillus thuringiensis* a través de amplificación génica de *zmaA* y *zmaC*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.
- Onco, M.; Sauka, D.; Pérez, M.; Benintende, G. 2015. Larvas de *Cydia pomonella* como fuente de aislamiento de *Bacillus thuringiensis*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.