



*Universidad de Buenos Aires*  
*Facultad de Farmacia y Bioquímica*

**Lugar de trabajo: Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMyZA)**  
**Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Castelar.**

**Factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis* y su  
utilización para el control de coleópteros de alto impacto en  
el Sector Agropecuario.**

*Trabajo de tesis para optar el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires*

**Autora: Melisa Paula Pérez**

Director: Dr. Diego Herman Sauka.

Directora Adjunta: Ing. Agr. Graciela Beatriz Benintende.

Consejero de Estudios: Prof. Bioq. Sergio Teves.

**Año 2016**

# Agradecimientos

A mi Director, el Dr. Diego Sauka, por brindarme sus conocimientos y tiempo a lo largo de la tesis, por guiarme, por su ayuda y paciencia, y por su predisposición incondicional, demostrando su calidad humana y profesional.

A mi Directora Adjunta, la Ing. Graciela Benintende, por estar siempre predispuesta a resolver mis dudas y brindarme el conocimiento necesario en cada etapa de mi tesis, tanto en lo profesional como en lo personal.

A mi Consejero de Estudios, el Prof. Bioq. Sergio Tevez, por darme su apoyo y resolver las dudas que se me planteaban.

Al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA y su gente, por abrirme sus puertas y darme todo su apoyo a lo largo de estos años.

Al CONICET, por otorgarme la beca para que pueda realizar la tesis.

A mis compañeros de Laboratorio: Analía, Carmen, Inés, Irma, Laura, Marcelo, Maxi y Nanci, por su ayuda, por los momentos compartidos y por estar siempre presentes.

Al Dr. Francheschi y al Dr. Vignone, por brindarme los ejemplares de *A. diaperinus* para el inicio de la cría.

A las personas que trabajan en la cría del picudo y de moscas domésticas, por brindarme el material necesario para realizar mis ensayos.

Al Lic. Matias Zapiola y el Dr. Jorge Arcas por brindarme sus conocimientos para el desarrollo del mejoramiento del medio de cultivo.

A la Dra. Viviana Barrera y el Dr. Eduardo Botto, por su seguimiento y consejos.

A mi compañero de vida, Jorge, por estar mi lado en este camino, por bancar mis días de locura y por darme su apoyo y amor siempre.

A mis papás, infinitas gracias, por apoyarme en cada elección en mi vida, por estar siempre presentes, por escucharme y aconsejarme, por su ayuda, sus palabras y amor incondicional.

A mi abuela, por cuidarme, prender una velita y rezar para que me vaya bien en cada paso.

A toda mi familia, a los que están y a los que desde el lugar donde se encuentren me dieron su apoyo.

A mis amigos, gracias por sus palabras, por escucharme siempre, acompañarme en este camino y por estar en cada paso de la vida. Y a mi hermosa ahijada, Delfi, por recibirme con esa sonrisa al final de cada jornada de trabajo.

## **Publicaciones relacionadas con el tema de trabajo**

Melisa Pérez, Diego Sauka, Graciela Benintende. "Control microbiano de *Alphitobius diaperinus* utilizando *Bacillus thuringiensis*". Resúmenes de la Jornada de actualización e intercambio en control biológico, comportamental y genético de plagas agropecuarias. Lopez, S.; Viscarret, M.; Sauka, D.; Segura, D.; La Fuente, L. 10-11. INTA Ediciones. Buenos Aires. ISBN 978-987-521-710-2. 2016.

## **Presentaciones a congreso relacionadas con el tema de trabajo**

Pérez M.P.; Sauka D.H.; Onco M.I.; Monella R.H.; Benintende G.B. "Búsqueda de *Bacillus thuringiensis* tóxicos para *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae)". XII Congreso Argentino de Microbiología. VI Congreso de la Sociedad Argentina de Bacteriología, Micología y Parasitología Clínica (SADEBAC). I Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DiMAyA). Buenos Aires. 2010.

Pérez M.P., Sauka D.H, Benintende G.B. "La  $\beta$ -exotoxina de *Bacillus thuringiensis* un factor limitante para el desarrollo de bioinsecticidas convencionales". VIII REDBIO Argentina 2011. Buenos Aires. 13 al 15 de noviembre. 2011. INTA, ARGENTINA

Pérez, M.; Sauka, D.; Onco, I.; Benintende, G. Caracterización de los factores de virulencia de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* responsables de la toxicidad para *Anthonomus grandis* Boheman. XIII Congreso Argentino de Microbiología. II Congreso de Microbiología Agrícola y Ambiental (DiMAyA). Septiembre 2013. Buenos Aires.

Pérez, M.; Sauka, D.; Onco, M.I.; Benintende, G. Determinación de caracteres fenotípicos y genotípicos en cepas de *Bacillus thuringiensis* patógenas para larvas de coleópteros. XV

Jornadas Argentinas de Microbiología: Adelantos tecnológicos en el diagnóstico microbiológico. Agosto 2014. Ciudad de Córdoba.

Sauka, D.; Onco M.I.; Pérez, M.; López, N.; Berretta, M.; Benintende, G. Rápida predicción de la producción de  $\beta$ -exotoxina de tipo I en *Bacillus thuringiensis* mediante amplificación génica. XV Jornadas Argentinas de Microbiología: Adelantos tecnológicos en el diagnóstico microbiológico. Agosto 2014. Ciudad de Córdoba.

Pérez, M.; Sauka, D.; Onco, M.; Benintende, G. Estudio de tamizaje de *Bacillus thuringiensis* tóxicos para *Alphitobius diaperinus*. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Noviembre 2015. Buenos Aires.

Pérez, M.; Sauka, D.; Onco, M.; Benintende, G. Caracterización de *Bacillus thuringiensis* INTA Mo4-4 tóxico para el escarabajo de la cama de pollo. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Noviembre 2015. Buenos Aires.

Pérez, M.; Sauka, D.; Onco, M.; Benintende, G. Toxicidad de *Bacillus thuringiensis* INTA Mo4-4 para *Alphitobius diaperinus*. Efecto de la solubilización y proteólisis *in vitro* de sus cristales sobre la actividad tóxica. XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. XVI Congreso Argentino de Microbiología. Septiembre 2016. Rosario-Santa Fe.

# Índice general

<b>Resumen</b> .....	1
<b>Introducción</b> .....	4
1. <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	4
1.1. Características generales.....	4
1.2. Taxonomía de <i>B. thuringiensis</i> .....	5
1.3. Ciclo biológico de <i>B. thuringiensis</i> .....	6
1.4. Hábitat y ecología de <i>B. thuringiensis</i> .....	7
1.5. Cristales paraesporales.....	7
1.6. Proteínas y otros metabolitos tóxicos para coleópteros producidos por <i>B. thuringiensis</i> .....	8
1.6.1. Proteínas Cry.....	8
1.6.2. Otros factores de virulencia.....	10
1.6.3. Estructura de las proteínas insecticidas.....	12
1.6.4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de tres dominios.....	13
1.7. Patogenicidad de <i>B. thuringiensis</i> para insectos coleópteros.....	16
1.8. Bioinsecticidas y plantas transgénicas para el manejo de coleópteros plagas.....	17
2. Coleópteros plaga de importancia en el Sector Agropecuario.....	19
2.1. <i>Anthonomus grandis</i> : el picudo del algodón.....	19
2.2. <i>Alphitobius diaperinus</i> : el escarabajo de la cama de pollos.....	22
<b>Objetivos e hipótesis</b> .....	25
<b>Materiales y métodos</b> .....	26
1. Cepas de <i>B. thuringiensis</i> empleadas en este estudio.....	26
2. Preparación de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> utilizadas en los distintos ensayos.....	30
3. Ensayos biológicos de toxicidad.....	31
3.1. Bioensayos “burdos”.....	31
3.2. Bioensayos “finos”.....	32
4. Detección cualitativa de $\beta$ -exotoxina.....	33
4.1. Método para ensayos múltiples.....	33

4.2. Método estándar.....	34
5. Caracterización morfológica de los cristales.....	34
6. Materiales y metodologías para el análisis de proteínas.....	34
6.1. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.....	34
6.2. Solubilización y tripsinización de los cristales.....	35
6.3. Cuantificación de proteínas.....	36
6.3.1. Método de Bradford (Bradford, 1976).....	36
6.3.2. Método de cuantificación en SDS-PAGE.....	36
7. Materiales y metodologías para el análisis de ácidos nucleicos.....	37
7.1. Extracción de ADN total.....	37
7.1.1. Método de hervor simple.....	37
7.1.2. Método descrito por Reyes-Ramírez e Ibarra (2005).....	37
7.2. Obtención de ADN plasmídico.....	38
7.3. Amplificación génica mediante PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	39
7.3.1. Mezcla de reacción.....	40
7.3.2. Parámetros de la reacción.....	40
7.3.3. Cebadores.....	41
7.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	42
7.5. Análisis filogenético de los resultados obtenidos mediante REP-PCR.....	42
8. Materiales y metodologías para la selección y mejoramiento de medios de cultivo.....	43
8.1. Preparación del inóculo.....	43
8.2. Medios de cultivo empleados.....	43
8.3. Diseños experimentales para el mejoramiento del medio de cultivo.....	44
8.4. Parámetros de medición.....	47
<b>Resultados y discusión.....</b>	<b>49</b>
<u>Sección 1:</u> Selección y caracterización de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> tóxicas para larvas de <i>Anthonomus grandis</i> .....	49
1.1. Tamizaje de cepas tóxicas para el picudo del algodonero.....	49
1.2. Correspondencia de niveles altos de toxicidad para <i>A. grandis</i> y la producción de $\beta$ -exotoxina.....	53

1.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas nativas seleccionadas.....	55
1.4. Identificación de factores de virulencia involucrados en la toxicidad para <i>A. grandis</i> .....	57
<b>Sección 2:</b> Selección y caracterización de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> tóxicas para larvas de <i>Alphitobius diaperinus</i> . Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa.....	62
2.1. Establecimiento de la cría de <i>A. diaperinus</i> .....	62
2.2. Tamizaje de cepas tóxicas para larvas del escarabajo de la cama de pollos.....	63
2.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas seleccionadas.....	66
2.4. Solubilización y tripsinización de los cristales de INTA Mo4-4.....	72
2.5. Identificación de factores de virulencia involucrados en la toxicidad para <i>A. diaperinus</i> .....	73
2.6. Bioensayos “finos” con <i>A. diaperinus</i> .....	74
2.6.1. Cuantificación de la virulencia de cepas tóxicas para <i>A. diaperinus</i> mediante ensayos de concentración letal media.....	74
2.6.2. Efecto de la solubilización y tripsinización <i>in vitro</i> de los cristales de INTA Mo4-4 sobre la actividad tóxica para <i>A. diaperinus</i> .....	75
2.7. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa de INTA Mo4-4.....	76
2.7.1. Selección de un medio de cultivo líquido.....	77
2.7.2. Determinación de los componentes del medio que son importantes para la producción de proteínas del cristal.....	78
2.7.3. Análisis de superficie de respuesta.....	80
2.7.4. Confirmación del mejoramiento del medio de cultivo.....	84
<b>Conclusiones</b> .....	86
<b>Referencias</b> .....	89
<b>Abreviaturas</b> .....	104

# Índice de tablas

## Introducción

<b>Tabla 1.</b> Características principales de los bioinsecticidas que poseen <i>B. thuringiensis</i> como ingrediente activo.....	18
<b>Tabla 2.</b> Eventos transgénicos Bt registrados en EE.UU para el manejo de coleópteros plagas.....	19

## Materiales y métodos

<b>Tabla 3.</b> Cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> utilizadas en diferentes etapas del estudio.....	26
<b>Tabla 4.</b> Cepas exóticas de <i>B. thuringiensis</i> utilizadas en diferentes etapas del estudio.....	30
<b>Tabla 5.</b> Mezcla de reacción para geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).	35
<b>Tabla 6.</b> Mezclas de reacción para PCR.....	40
<b>Tabla 7.</b> Parámetros generales de reacción de PCR.....	40
<b>Tabla 8.</b> Mezclas de cebadores utilizados en este trabajo.....	41
<b>Tabla 9.</b> Composición de los medios de cultivo empleados para la cepa seleccionada por su toxicidad para <i>A. diaperinus</i> .....	44
<b>Tabla 10.</b> Matriz con los 12 experimentos diseñados por Plackett-Burman.....	44
<b>Tabla 11.</b> Valores de los niveles de los distintos componentes del medio.....	45
<b>Tabla 12.</b> Valores de los niveles de las dos variables seleccionadas.....	46
<b>Tabla 13.</b> Matriz con los experimentos diseñados por DCC.....	46

## Resultados y discusión

Sección 1: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis*.

<b>Tabla 14.</b> Actividad tóxica de cultivos completos de cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>A. grandis</i> .....	50
---	----

<b>Tabla 15.</b> Actividad tóxica de cultivos completos de cepas exóticas de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>A. grandis</i> .....	52
<b>Tabla 16.</b> Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas más tóxicas.....	55
<b>Tabla 17.</b> Actividad tóxica de las diferentes fracciones de los cultivos de las cepas seleccionadas por su toxicidad para <i>A. grandis</i> .....	59

Sección 2: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Alphitobius diaperinus*. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa.

<b>Tabla 18.</b> Actividad tóxica de cultivos completos de cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas del 2º estadio de <i>A. diaperinus</i> .....	64
<b>Tabla 19.</b> Actividad tóxica de cultivos completos de cepas exóticas de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas del 2º estadio de <i>A. diaperinus</i> .....	65
<b>Tabla 20.</b> Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas más tóxicas...	66
<b>Tabla 21.</b> Actividad tóxica de las diferentes fracciones del cultivo de INTA Mo4-4.....	73
<b>Tabla 22.</b> Análisis Probit de las cepas más tóxicas para larvas de 2º estadio de <i>A. diaperinus</i> .....	74
<b>Tabla 23.</b> Análisis Probit de la biomasa activa de la cepa INTA Mo4-4 sometida a distintos tratamientos.....	76
<b>Tabla 24.</b> Mediciones de densidad óptica, pH y cuantificación de proteínas de INTA Mo4-4 en caldos de esporulación.....	77
<b>Tabla 25.</b> Mediciones de densidad óptica, pH, cuantificación de proteínas y recuento de esporas de INTA Mo4-4 en caldo BM y caldo BM con almidón soluble.....	78
<b>Tabla 26.</b> Valores de la concentración de proteínas experimental y predicha en los medios diseñados por Plackett-Burman.....	78
<b>Tabla 27.</b> Valores de la concentración de proteínas experimental y predicha de los medios diseñados por DCC.....	81
<b>Tabla 28.</b> Resultados del análisis de regresión y valores <i>t</i> y <i>p</i> correspondientes al modelo de segundo orden para el mejoramiento de la producción de proteínas.....	82
<b>Tabla 29.</b> Comparación de la producción de proteínas y otros parámetros medidos,	

obtenidos a partir del cultivo de INTA Mo4-4 en el medio basal y el mejorado..... 84

**Tabla 30.** Actividad tóxica de INTA Mo4-4 cultivada en el medio basal y en el medio mejorado, frente a larvas de 2º estadio de *A. diaperinus*..... 85

# Índice de figuras

## Introducción

<b>Fig. 1.</b> Imagen de microscopia electrónica de transmisión de <i>B. thuringiensis</i> en fase de esporulación y formación de cuerpos cristalinos.....	5
<b>Fig. 2.</b> Esquema del ciclo de desarrollo de <i>B. thuringiensis</i> .....	7
<b>Fig. 3.</b> Estructura tridimensional de toxinas representativas producidas por <i>B. thuringiensis</i> .....	13
<b>Fig. 4.</b> Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios en lepidópteros.....	15
<b>Fig. 5.</b> Ciclo de vida de <i>A. grandis</i> .....	20
<b>Fig. 6.</b> Ciclo de vida de <i>A. diaperinus</i> .....	23

## Resultados y Discusión

Sección 1: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis*.

<b>Fig. 7.</b> Número de cepas nativas y exóticas de <i>B. thuringiensis</i> productoras y no productoras de $\beta$ -exotoxina en relación a su mortalidad para <i>A. grandis</i> .....	54
<b>Fig. 8.</b> Caracterización de cepas nativas y exóticas de <i>B. thuringiensis</i> seleccionadas.....	56
<b>Fig. 9.</b> Dendograma estimado de los perfiles electroforéticos de REP-PCR obtenidos de cepas de referencia y nativas seleccionadas de <i>B. thuringiensis</i> .....	57

Sección 2: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Alphitobius diaperinus*. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa.

<b>Fig. 10.</b> Evolución de los cultivos bacterianos de las cepas seleccionadas de <i>B. thuringiensis</i> en caldo BM empleando microscopía de contraste de fases.....	68
<b>Fig. 11.</b> Análisis electroforético de las proteínas que forman los cristales.....	69

<b>Fig. 12.</b> Detección de genes que codifican factores de virulencia.....	70
<b>Fig. 13.</b> Perfil electroforético y representación esquemática de INTA Mo4-4, <i>morrisoni</i> cepa <i>tenebrionis</i> DSM2803 y de otras cepas de <i>B. thuringiensis</i> obtenidos mediante REP-PCR.....	71
<b>Fig. 14.</b> Dendograma estimado de los perfiles electroforéticos de REP-PCR obtenidos de INTA Mo4-4, <i>morrisoni</i> cepa <i>tenebrionis</i> DSM2803 y de cepas de referencia de <i>B. thuringiensis</i> , empleando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA.....	71
<b>Fig. 15.</b> Análisis electroforético de proteínas solubilizadas y solubilizadas y digeridas con tripsina de <i>B. thuringiensis</i> INTA Mo4-4.....	72
<b>Fig. 16.</b> Gráfico de Pareto con los efectos estandarizados de cada uno de los componentes del caldo BM con almidón soluble.....	79
<b>Fig. 17.</b> Gráfico de superficie de respuesta estimada del DDC mostrando la interacción de los niveles de extracto de levadura y almidón soluble sobre la producción de proteínas obtenidas.....	82
<b>Fig. 18.</b> Efectos simples e interacciones del DCC frente a la concentración de proteínas.....	83



# *Resumen*



# Resumen

La necesidad de contar con herramientas seguras y efectivas para el manejo de plagas, alternativas o complementarias a los insecticidas químicos, estimula el interés en usar entomopatógenos como agentes de biocontrol. *Bacillus thuringiensis* es entre ellos, el patógeno más exitoso en cumplir este objetivo, y el que además mantiene potencial para seguir desarrollándose.

En este estudio se trabajó en la selección y caracterización de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para larvas de dos especies de coleópteros plagas que son de gran importancia en el Sector Agropecuario: el picudo del algodón (*Anthonomus grandis*) y el escarabajo de la cama de pollos (*Alphitobius diaperinus*). Asimismo, se trabajó en el mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa de una cepa nativa de *B. thuringiensis* con vistas a la elaboración de un bioinsecticida.

En una primera etapa, se realizaron bioensayos preliminares con cultivos completos de 124 cepas de *B. thuringiensis* con larvas neonatas de *A. grandis*. Se seleccionaron tres cepas exóticas y cuatro nativas por causar porcentajes de mortalidad superiores al 50%. Todas ellas eran productoras de  $\beta$ -exotoxina. Las cepas nativas compartieron una morfología similar de cristales parasporales, un perfil de proteínas similar y los mismos genes insecticidas. Sus características hacen que se parezcan a cepas tóxicas para Lepidópteros. Además mostraron un perfil de REP-PCR idéntico al de la cepa lepidopterocida HD-1, sugiriendo que podrían pertenecer al serovar *kurstaki*. Sin embargo, se observaron diferencias en el perfil plasmídico y en la producción de  $\beta$ -exotoxina. Para determinar en qué fracción del cultivo se encontraban los metabolitos responsables de la toxicidad, se realizaron bioensayos utilizando *pellets* resuspendidos y sobrenadantes filtrados, comparándolos con los cultivos completos. Ambas fracciones mostraron diferentes niveles de toxicidad. Los resultados sugieren que los principales factores de virulencia se encuentran en el sobrenadante y estarían directamente relacionados con la presencia de  $\beta$ -exotoxina. De acuerdo con los bioensayos de los sobrenadantes filtrados y sobrenadantes filtrados y autoclavados, no se descartaría también la participación de factores de virulencia termolábiles como Cry1Ia en la toxicidad. En las cepas seleccionadas el principal factor de virulencia sería la  $\beta$ -exotoxina, por lo que su uso no sería posible de acuerdo a la reglamentación vigente. No obstante, estas

podrían ser fuente de genes (ej: *cry1la*) para la producción de plantas transgénicas resistentes a dicha plaga.

En una segunda etapa, se realizaron bioensayos preliminares con cultivos completos de 42 cepas de *B. thuringiensis* con larvas de 2º estadio de *A. diaperinus*. Las cepas evaluadas no resultaron tóxicas o presentaron porcentajes de mortalidad menores al 10%, exceptuando la cepa nativa INTA Mo4-4 y *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803. Ninguna de estas dos cepas demostró producir  $\beta$ -exotoxina, sugiriendo que este metabolito no tendría un papel preponderante en la patogenicidad. Ambas cepas presentaron morfología similar de cristales, un perfil de proteínas similar y los mismos genes insecticidas. Sin embargo, alguna diferencia surgió cuando se compararon los perfiles electroforéticos de REP-PCR. Ambas cepas mostraron perfiles similares que difieren por la presencia de una banda polimórfica en INTA Mo4-4. Estas similitudes sugieren que esta cepa podría representar una variante dentro del serovar *morrisoni*. Al igual que para *A. grandis*, se analizó en qué fracción del cultivo se encontraban los metabolitos responsables de la toxicidad. Los resultados mostraron que los metabolitos tóxicos principales se encontrarían en el *pellet* y se asociarían a proteínas Cry3. Se cuantificó la virulencia del *pellet* seco y molido de ambas cepas para la estimación de la concentración letal media y de otros parámetros estadísticos empleando bioensayos “finos”. La cepa INTA Mo4-4 resultó significativamente más tóxica que la cepa *tenebrionis* DSM2803. Se observó además que la solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales de INTA Mo4-4 no influyen significativamente sobre su virulencia. Por lo expuesto, la cepa nativa INTA Mo4-4 se constituyó como la mejor opción para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nuevo destinado al manejo de *A. diaperinus*. Teniendo en cuenta esta premisa, se seleccionó el caldo BM con almidón soluble como medio propicio para la producción de INTA Mo4-4, debido a que fue en él donde se logró una mayor producción de proteínas totales. Posteriormente, se empleó un diseño de Plackett-Burman para determinar cuáles de los ocho componentes del caldo mencionado afectaban significativamente la producción de proteínas de la biomasa activa. Se obtuvo de ese estudio que el extracto de levadura es un componente importante del caldo BM, que influyó significativamente y positivamente en la producción de proteínas. La glucosa y el almidón (fuentes de C) demostraron respectivamente, un efecto negativo y positivo, aunque no significativo, sobre la producción de proteínas. Sabiendo que las proporciones de C:N en los medios de cultivo son

importantes para el crecimiento normal de *B. thuringiensis* y la producción de proteínas Cry, y considerando que el análisis de Plackett-Burman sólo detecta efectos principales sin tener en cuenta interacciones, resultó de interés avanzar en el estudio de la interacción entre el extracto de levadura y el almidón soluble. Los dos componentes seleccionados fueron optimizados utilizando un diseño central compuesto rotatorio. Se logró mejorar el caldo BM con la información generada. Se obtuvo una producción de proteínas insecticidas de INTA Mo4-4 significativamente mayor respecto al medio original, lo que se tradujo en un aumento significativo de la toxicidad para *A. diaperinus*.



# *Introducción*



# Introducción

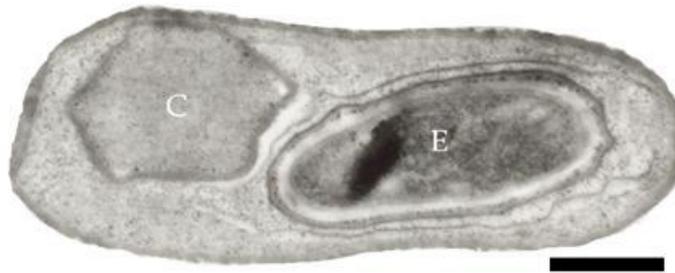
El manejo integrado de plagas (MIP) es una estrategia que consiste en la integración de las diferentes tácticas empleadas en el control de plagas. Estas tácticas pueden incluir el control mecánico, físico, cultural, genético, químico y biológico de la plaga (Fischbein, 2012). El control microbiano, rama del control biológico, es un método que emplea organismos vivos microscópicos (bacterias, hongos, virus y nemátodos) para reducir la densidad de la población y los efectos dañinos de otros organismos plaga (Lecuona, 1996), siendo una plaga cualquier organismo que produce un daño o reduce la disponibilidad y la calidad de un recurso humano (Hajek, 2004). Los insectos del Orden Coleoptera se encuentran entre los que causan mayor daño en el Sector Agropecuario, causando disminución en los rendimientos y en la calidad de la producción con consecuentes pérdidas económicas, sumado a la complejidad para su manejo y la masiva y nociva utilización de insecticidas de síntesis química, involucrando serios riesgos medio ambientales.

Hoy en día existe una necesidad crítica de contar con herramientas seguras y efectivas, alternativas o complementarias a los insecticidas químicos, para el manejo de este tipo de insectos plagas. Esto estimula considerablemente el interés en usar entomopatógenos como agentes de biocontrol. El patógeno más exitoso en cumplir este objetivo y que además mantiene potencial para seguir desarrollándose, es la bacteria con cualidades insecticidas *Bacillus thuringiensis*.

## **1. *Bacillus thuringiensis*.**

### **1.1. Características generales.**

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria Gram positiva, con forma de bastón, que mide de 3 a 5  $\mu\text{m}$  de largo por 1 a 1,2  $\mu\text{m}$  de ancho, de flagelación períttrica y que posee la característica de desarrollar esporas de resistencia que no provocan la distensión del perfil bacilar (Sauka y Benintende, 2008) (Fig. 1).



**Fig. 1.** Imagen de microscopía electrónica de transmisión de *B. thuringiensis* en fase de esporulación y formación de cuerpos cristalinos. C: cristal parasporal; E: espora. Barra, 0,5  $\mu\text{m}$ . Tomado de Sauka y Benintende (2008).

Es un microorganismo anaerobio facultativo, quimioorganotrofo y con actividad de catalasa. Las distintas cepas de *B. thuringiensis* presentan características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina (Sauka y Benintende, 2008).

No obstante, la característica principal de *B. thuringiensis* es producir cristales paraesporales de naturaleza proteica (proteínas Cry y Cyt) durante la esporulación, los que junto a otros factores de virulencia (proteínas Vip, Sip,  $\beta$ -exotoxina, fosfatasas, etc.) liberados al medio durante la fase vegetativa de crecimiento, son responsables de la toxicidad que esta especie presenta para distintos invertebrados, fundamentalmente larvas de insectos (Sauka y Benintende, 2008). Esto condujo a que hoy en día los insecticidas biológicos formulados con esporas y cristales de *B. thuringiensis* como ingrediente activo, sean los más comercializados a nivel mundial (Roh *et al.*, 2007; Rosas-García, 2008), y que genes que codifican sus proteínas insecticidas sean utilizados en la generación de plantas transgénicas conocidas simplemente como plantas "Bt" (Sanchis, 2011).

## 1.2. Taxonomía de *B. thuringiensis*.

La especie pertenece al género *Bacillus* que se incluye en la familia Bacillaceae. Dentro de este género, *Bacillus thuringiensis* forma parte del grupo 1, también llamado grupo *Bacillus cereus*, el que además de estas dos especies está constituido por: *Bacillus anthracis*, *Bacillus cytotoxicus*, *Bacillus mycoides*, *Bacillus pseudomycoides*, *Bacillus toyonensis*, *Bacillus wiedmannii* y *Bacillus weihenstephanensis* (Sauka y Benintende, 2008; Guinebretière *et al.*,

2013, Jiménez *et al.*, 2013; Miller *et al.*, 2016). Otras tres cepas del grupo *B. cereus* (*Bacillus gaemokensis*, *Bacillus manliponensis* y *Bacillus bingmayongensis*) se propusieron como nuevas especies pero no han sido validadas aún (Jung *et al.*, 2010; Jung *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

Si bien todos los miembros del grupo *B. cereus* constituyen un grupo de bacterias estrechamente relacionadas, *B. thuringiensis* está más emparentada con *B. cereus* y *B. anthracis*, de las que no es fácil diferenciarlas debido a las grandes similitudes morfológicas y bioquímicas. Sin embargo, *B. thuringiensis* se diferencia por la presencia de cristales parasporales y sus propiedades insecticidas (Sauka y Benintende, 2008).

*Bacillus thuringiensis* se ha clasificado en 84 serovares mediante serotipificación del antígeno flagelar H. Se trató de establecer relaciones entre estos serovares y su actividad insecticida o la presencia de algún tipo de cristal en particular sin tener éxito, por lo que su significado biológico no está claro (Sauka y Benintende, 2008). Se establecieron métodos alternativos de tipificación de *B. thuringiensis*, basados en técnicas de biología molecular (por ej. amplificación génica de *hag* y posterior secuenciación, *fingerprinting* mediante análisis de secuencias repetitivas extragénicas poliandrómicas específicas (REP-PCR)), que demostraron un poder discriminativo alto y capacidad para identificar los distintos serovares (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2005; Xu y Côté, 2006).

### **1.3. Ciclo biológico de *B. thuringiensis*.**

Comienza con la germinación de las esporas, que dura solo unos minutos en condiciones ambientales y nutricionales adecuadas. Luego aparece la célula vegetativa que, en un ambiente rico en nutrientes, se multiplica exponencialmente mediante fisión binaria. Aunque *B. thuringiensis* sea anaerobia facultativa, crece y prolifera comúnmente en condiciones aerobias. La temperatura óptima para su crecimiento se ubica entre los 26 y 30°C, pero puede también hacerlo entre los 15 y 45°C. En cuanto al pH donde crece, puede variar entre 5,5 y 8,5, siendo el rango óptimo entre 6,5 y 7,5 (Bernhard y Utz, 1993).

La fase de crecimiento vegetativo finaliza cuando uno o más nutrientes se agotan, o el medio se torna físicamente adverso, y comienza la fase de esporulación que coincide con el cambio de fase de crecimiento exponencial a fase estacionaria. En esta fase se produce en forma simultánea la formación de la espora y del cristal, y a la célula se la denomina esporangio. Las esporas y los cristales son liberados al medio tras la lisis celular (Fig. 2).

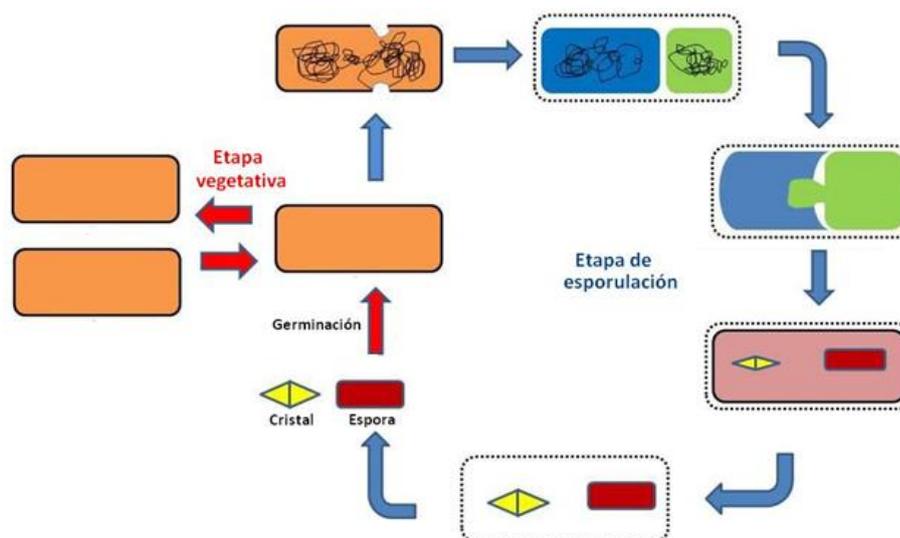


Fig. 2. Esquema del ciclo de desarrollo de *B. thuringiensis*.

#### 1.4. Hábitat y ecología de *B. thuringiensis*.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria cosmopolita debido a su capacidad de vivir en diferentes ecosistemas terrestres como ser zonas de alta montaña, estepas, bosques tropicales, desiertos, etc. (Bravo *et al.*, 1998; Quesada-Moraga *et al.*, 2004; Uribe *et al.*, 2003). A su vez puede ser aislada de diversos sistemas como por ejemplo el suelo, donde se lo encuentra con mayor frecuencia y las esporas mantienen su viabilidad durante años, por lo que se lo considera un microorganismo asociado a éste (Armengol *et al.*, 2007; Jara *et al.*, 2006). Otros nichos ecológicos donde se puede encontrar *B. thuringiensis* son el filoplano de plantas, residuos de molienda de granos o polvo de silos, insectos sanos, enfermos o muertos, telarañas, aguas estancadas y los fondos de lugares anegados donde se desarrollan larvas de mosquitos (Haloi *et al.*, 2016; Maduell *et al.*, 2002; Onco *et al.*, 2015; Sauka, 2007; Sauka *et al.*, 2010). Este último es una de los pocos hábitats naturales donde se han descrito casos de epizootias para *B. thuringiensis* (Goldberg y Margalit, 1997).

#### 1.5. Cristales paraesporales.

Los cristales paraesporales de *B. thuringiensis* se sintetizan desde el instante en el que ocurre el englobamiento de la pre-espora hasta su maduración, en simultaneidad con la formación de la espora. Varios factores condicionan la cristalización de las proteínas Cry, entre los que están la estructura secundaria, la formación de puentes disulfuro entre residuos cisteína y la presencia de componentes adicionales en el cristal; también los

mecanismos de cristalización varían entre las distintas morfologías de los cristales (Agaisse y Lereclus, 1995). Estos cuerpos proteicos pueden representar hasta el 30% del peso seco del esporangio (Bulla *et al.*, 1980). Existen distintas morfologías, clasificándose en bipiramidales, cúbicos, cuadrados aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan, 2001).

Existe una fuerte relación entre la morfología de ciertos tipos de cristales, las proteínas Cry que los constituyen, los genes que los codifican y la actividad insecticida (Sauka y Benintende, 2008). Por ej., para el caso de cristales conformados por proteínas tóxicas para coleópteros, se pudo establecer una fuerte asociación entre la forma cuadrada aplanada de los cristales, una proteína de *ca.* 72 kDa y genes *cry3* (Sauka y Benintende, 2008). También se asociaron cristales ovoides con una proteína de *ca.* 130 kDa y genes *cry8* (Amadio *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014).

Como se describió anteriormente, el cristal paraesporal se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora, para ser finalmente liberado tras la lisis celular. Se describieron casos donde se encontró al cristal dentro del exosporio, por lo que se mantenía unido a la espora cuando la célula lisaba (Huber y Lüthy, 1981; López-Meza e Ibarra, 1996). En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero permaneciendo ambos indefinidamente dentro de un esporangio que no lisa (Sauka y Benintende, no publicado).

Cada cristal está conformado por una o varias proteínas Cry, en algunos casos también Cyt, que se agrupan entre sí mediante puentes disulfuro (Iriarte y Caballero, 2001). La estabilidad de estas uniones condiciona el pH de solubilización del cristal. Gracias a la presencia de chaperonas que estabilizarían la estructura del cristal y evitarían la degradación por proteasas, se preservan los cristales dentro de la célula (Crickmore y Ellar, 1992).

### **1.6. Proteínas y otros metabolitos tóxicos para coleópteros producidos por *B. thuringiensis*.**

#### **1.6.1. Proteínas Cry.**

Las proteínas Cry son los principales constituyentes de los cristales y representan un grupo diverso y el más abundante de proteínas insecticidas producidas por *B. thuringiensis*

(Palma *et al.*, 2014). Se clasifican en un conjunto de 74 grupos principales divididos en diferentes clases y subclases juzgadas en base a un análisis de similitud de sus secuencias de aminoácidos e información estructural derivada a partir de cristalografía de rayos X (*B. thuringiensis* toxin nomenclature website en <http://www.btnomenclature.info/>) (Crickmore *et al.* 2016). Las diferencias aminoacídicas que presentan se traducen comúnmente en las variaciones a nivel de toxicidad y especificidad (Tounsi *et al.*, 1999). Las proteínas Cry muestran en general espectros de actividad reducida y muchas veces acotados a unas cuantas especies de insectos pertenecientes a un mismo orden. Los genes que codifican estas proteínas (genes *cry*), siguen su correspondiente clasificación.

Las proteínas Cry se sintetizan como protoxinas que son activadas proteolíticamente para generar el fragmento activo (toxina), conocido como  $\delta$ -endotoxina (Sauka y Benintende, 2008). Se ha visto un efecto sinérgico entre las esporas y las  $\delta$ -endotoxinas de algunas cepas (Liu *et al.*, 1998). No se conoce bien el mecanismo por el cual la espora tiene efecto potenciador, pero se sabe que no solo depende de la germinación de la espora sino también de las proteínas presentes en su cubierta (Johnson *et al.*, 1998).

Se conocen distintas proteínas Cry que presentan distintos grados de toxicidad para coleópteros: Cry3, Cry7, Cry9Da, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 y Cry55. También existen otras que presentan una actividad dual frente a otro orden de insectos, tal como los casos de Cry1B, Cry8, y Cry1Ia (lepidópteros y coleópteros), Cry6A y Cry14 (nemátodos y coleópteros) y Cry51 (hemípteros y coleópteros).

Las Cry3 son las más conocidas, especialmente las Cry3A. Son proteínas de *ca.* 72 kDa que se combinan para formar cristales proteicos cuadrados aplanados. Son activadas por proteasas asociadas a esporas en toxinas de *ca.* 67 kDa (Höfte y Whiteley, 1989). Están codificadas por genes que constan de un marco abierto de lectura que rondan los 1900 pb, que tienen la particularidad de ser expresados durante el crecimiento vegetativo a diferencia de otros genes *cry* (Sekar *et al.*, 1987).

Otro grupo bien conocido es el de las Cry8. Son proteínas de *ca.* 130 kDa que se agrupan conformando cristales ovoides. Estas proteínas son activadas proteolíticamente en un fragmento de 60-70 kDa que es tóxico para coccinélidos (Navas *et al.*, 2014), escarabeídos (Shu *et al.*, 2009) y también para algunos lepidópteros (por ej. *Anticarsia gemmatalis*) (Amadio *et al.*, 2013). Los genes *cry8* constan de 3500 pb aproximadamente, coexisten más

de uno distinto por cepa y se pueden encontrar juntos constituyendo islas de patogenicidad dentro de megaplásmidos (Navas *et al.*, 2016).

Tanto las Cry23Aa y Cry37Aa como Cry34 y Cry35 constituyen “proteínas insecticidas binarias”, es decir que se requieren ambas para ejercer su efecto tóxico para larvas de distintas especies de crisomélidos (Palma *et al.*, 2014; Ellis *et al.*, 2002). En un estudio específico de distribución de genes *cry34* y *cry35*, se hallaron éstos simultáneamente con una frecuencia baja de detección en *B. thuringiensis* provenientes de Asia, Australia, América del Sur y del Norte (Schnepf *et al.*, 2005).

Las Cry18 son producidas por *Paenibacillus popilliae* y no por *B. thuringiensis* (Zhang *et al.*, 1997). Se ha utilizado esta bacteria en los Estados Unidos de América por más de cincuenta años en el control biológico de larvas del escarabajo “Japonés” (*Popillia japonica*). Por otra parte, las Cry43 fueron aisladas de otra bacteria distinta a *B. thuringiensis* llamada *Paenibacillus lentimorbus* y también de otra cepa de *P. popilliae* (Yokoyama *et al.*, 2004). La producción de estas proteínas por bacterias diferentes a *B. thuringiensis* demuestra que las Cry no estarían restringidas únicamente a éstas, sino que estarían más distribuidas en la naturaleza de lo que se pensó inicialmente.

### 1.6.2 .Otros factores de virulencia.

Además de las proteínas Cry tóxicas para coleópteros que forman los cristales en la fase de esporulación, *B. thuringiensis* puede liberar otros factores de virulencia durante la fase vegetativa de crecimiento que pueden llegar a producir o asistir con la muerte del insecto. Algunos presentan alta especificidad como las proteínas Vip (del inglés *Vegetative insecticidal protein*) y las proteínas Sip (del inglés *Secreted insecticidal protein*), mientras que otros no distinguen el tipo de insectos que afectan (por ej.:  $\beta$ -exotoxina, fosfolipasas, enterotoxinas, hemolisinas, metaloproteasas, quitinasas) (Sauka y Benintende, 2008).

Las Vip son proteínas insecticidas no relacionadas con las Cry, no forman inclusiones cristalinas y se secretan al medio durante el crecimiento vegetativo de la bacteria (Estruch *et al.*, 1996). Se han descrito 4 grupos: Vip1, Vip2, Vip3 y Vip4; su sistema de nomenclatura es el mismo que se aplica para las toxinas Cry (Crickmore *et al.*, 2016).

Vip1 y Vip2 constituyen una toxina binaria, es decir que se requiere ambas para que sea activa; tiene acción insecticida contra varios coleópteros (de Maagd *et al.*, 2003) y *Aphis*

*gossypii* (Hemiptera) (Sattar y Maiti, 2011). Vip3 es tóxica para lepidópteros (Estruch *et al.* 1996), mientras que de Vip4 no se conoce la actividad ni su rango de hospedadores.

Los genes *vip1* y *vip2* se encuentran en un mismo operón, cada uno contiene un péptido señal N-terminal. El N-terminal de Vip1 es procesado después de la secreción. Posiblemente su modo de acción es similar a las toxinas binarias A+B, en la que Vip2 es el dominio A citotóxico y Vip1 es el dominio de unión al receptor responsable de la translocación de Vip2 dentro de la célula huésped; una vez dentro Vip2 actúa como ADP-ribosiltransferasa en la actina lo que bloquea la polimerización y conduce a la muerte de la célula (Palma *et al.*, 2014).

Otras de las proteínas insecticidas que se liberan durante la fase vegetativa son las Sip, de las cuales solo se conoce la Sip1Aa1 (Donovan *et al.*, 2006). Tiene 21% de identidad con 141 aminoácidos de la proteína mosquitocida Mtx3 de *Lysinibacillus sphaericus*; no se conoce su mecanismo de acción pero posee propiedades insecticidas para coleópteros. Es letal para *L. decemlineata* (Coleoptera: Chrysomelidae) y retarda el crecimiento de *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae) y *D. virgifera virgifera* (Donovan *et al.*, 2006).

Las  $\beta$ -exotoxinas son toxinas termoestables, no proteicas, producidas durante la fase vegetativa sólo por algunas cepas de *B. thuringiensis*. Son compuestos inespecíficos que resultan tóxicos para diversos insectos y nemátodos (Liu *et al.*, 2014). En insectos afecta el proceso de muda y desarrollo de pupas produciendo efectos teratogénicos (Burjeon *et al.*, 1969). Poseen cierto grado de toxicidad para células de mamíferos y persistencia en el ambiente (Beebe *et al.*, 1972). La reglamentación vigente de los entes regulatorios de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* prohíbe el uso de cepas que producen este metabolito como ingrediente activo de los mismos (Rosell *et al.*, 2008).

Existen dos tipos de  $\beta$ -exotoxina: la de tipo I y la de tipo II (Liu *et al.*, 2014). La de tipo I es la que se detecta más frecuentemente. Esta toxina, también llamada “thuringiensina”, fue considerada por años un metabolito estructuralmente similar al ATP. No obstante, Liu *et al.* (2010) propusieron que es un polisacárido de adenosina en lugar de un análogo de adenina. Se la considera un inhibidor de la ARN polimerasa por competir con el ATP por sitios de unión (Sebesta y Horska, 1970).

Liu *et al.* (2010) clonaron y secuenciaron el *cluster* de 11 ORFs involucrados en la síntesis de esta  $\beta$ -exotoxina de tipo I que está localizado en un megaplásmido de 110 kb. Uno de

estos ORFs codifica la proteína ThuE, que demostró ser la responsable de la fosforilación de un precursor de  $\beta$ -exotoxina en el paso final de su proceso de síntesis.

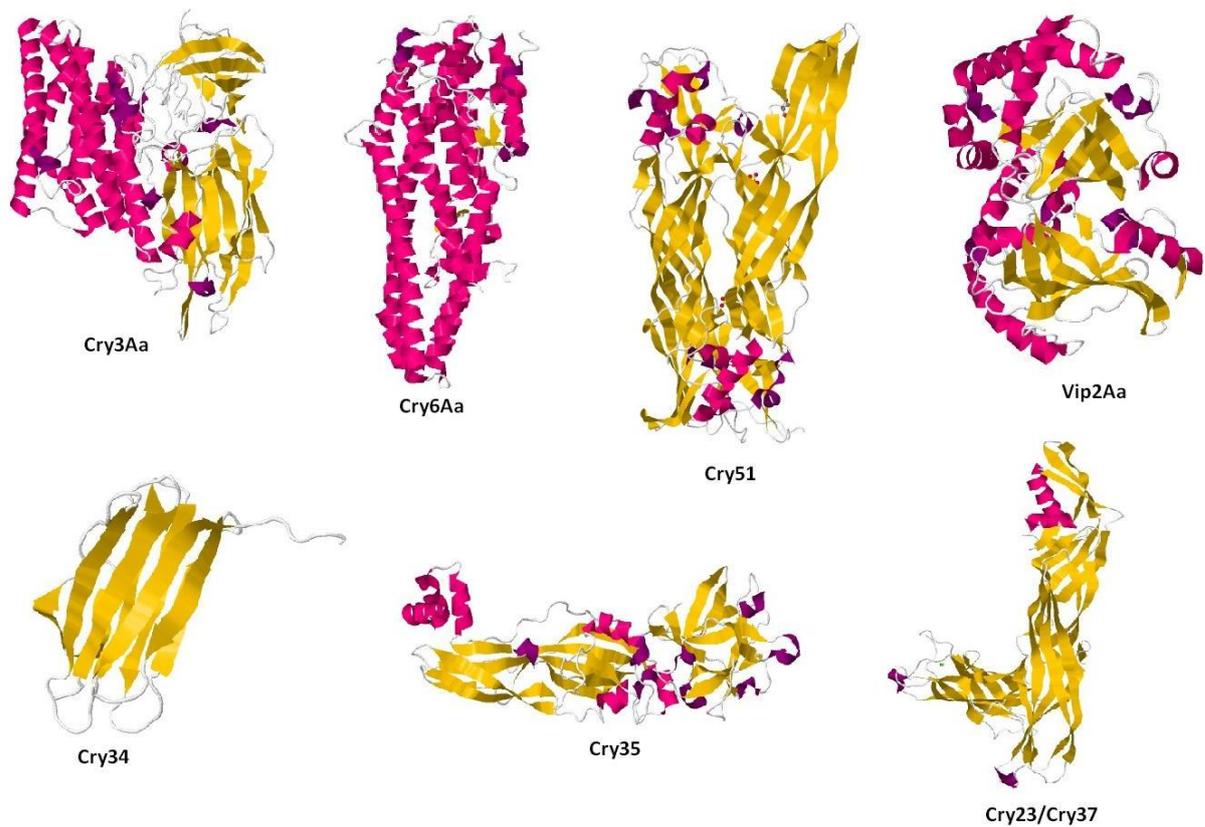
La producción de  $\beta$ -exotoxina puede evidenciarse a través de diferentes métodos. Entre ellos se destacan la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y bioensayos con larvas de *Musca domestica* u otros insectos (Liu *et al.*, 2014). Todos estos métodos tienen en común que son laboriosos y requieren mucho tiempo de trabajo. En ese sentido, se estableció una estrategia que consta de dos métodos basados en amplificación génica (PCR) para la predicción rápida de la producción de  $\beta$ -exotoxina de tipo I en *B. thuringiensis* (Sauka *et al.*, 2014).

### 1.6.3. Estructura de las proteínas insecticidas.

La estructura tridimensional de las proteínas coleopteridas Cry3Aa, Cry3Bb y Cry8Ea, en su forma activa, fue elucidada a través de cristalografía de rayos X (Fig. 3) (Galitsky *et al.*, 2001; Guo *et al.*, 2009; Li *et al.*, 1991). Todas ellas muestran una topología común de tres dominios que también comparten con otras proteínas de diferente espectro de acción: Cry1Aa y Cry1Ac (tóxicas para lepidópteros), Cry2Aa (toxicidad dual para lepidópteros y dípteros), Cry4Aa y Cry4Ba (tóxicas para dípteros), Cry5B (tóxicas para nemátodos) (Xu *et al.*, 2014).

El dominio I de estas proteínas Cry está formado por siete estructuras  $\alpha$ -hélice, donde una hélice central está rodeada por las otras seis. Este dominio participaría en la formación del poro en la membrana de las células intestinales del insecto susceptible. El dominio II está formado por tres láminas de estructura  $\beta$  en antiparalelo y participaría en la interacción con el receptor, por lo que sería determinante en la especificidad. El dominio III, es un  $\beta$ -sandwich en antiparalelo que también estaría involucrado en la estabilidad de la toxina, la unión al receptor y la formación del poro (de Maagd *et al.*, 2001).

Por otra parte, se determinó la estructura tridimensional de otras toxinas coleopteridas que resultaron no estar formadas por la estructura clásica de los tres dominios (Fig. 3). Tales son los casos de Cry6Aa (Dementiev *et al.*, 2016), Cry51 (Xu *et al.*, 2015), Vip2Aa (Han *et al.*, 1999) y las toxinas binarias Cry23/37 (Rydel *et al.*, 2001) y Cry34/Cry35 (Kelker *et al.*, 2014).



**Fig. 3.** Estructura tridimensional de toxinas representativas producidas por *B. thuringiensis*. Cry3Aa (PDB: 1DLC) es un ejemplo de la familia de las toxinas Cry de tres dominios; Cry6Aa (PDB: 5KUC) es una toxina alfa helicoidal; Cry51 es un miembro de la familia Etx / Mtx2 (PDB: 4PKM); Vip2Aa (1 QS1); Cry34 es una proteína similar a la aegerolisina (PDB: 4JOX) que actúa como una toxina binaria con Cry35, una proteína de la familia Toxin\_10 (PDB: 4JP0); la toxina binaria Cry23/Cry37 (PDB: 4RHZ) es un ejemplo de toxinas Cry-like-Mtx.

#### 1.6.4. Mecanismo de acción de las proteínas Cry de tres dominios.

Las larvas del insecto susceptible ingieren cristales y esporas de *B. thuringiensis* que se encuentran presentes en su dieta. Estos atraviesan prácticamente intactos el primer tramo del tubo digestivo (estomodeum), hasta llegar al intestino medio (mesenterón). El conjunto de reacciones que se llevan a cabo para que una toxina Cry de tres dominios ejerza su efecto han sido estudiadas primordialmente en el contexto Lepidoptera. Este Orden de insectos presenta intestinos medios con alta alcalinidad, con enzimas digestivas propicias para la disolución y activación de las proteínas (Dow, 1986). Por el contrario, el pH intestinal de las larvas de ciertos coleópteros puede ser de neutro a ácido (Koller *et al.*, 1992; Linser *et al.*,

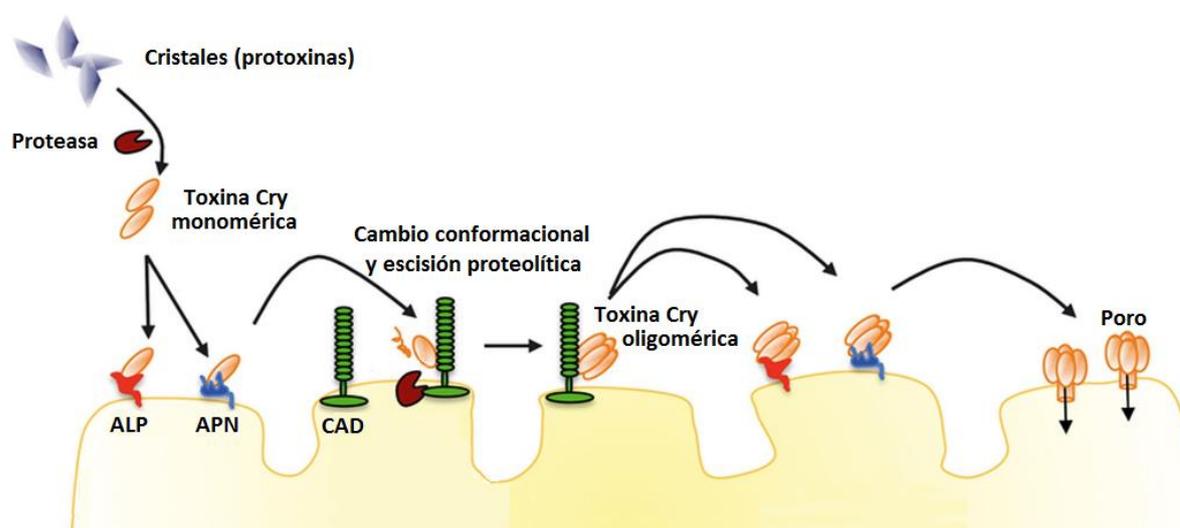
2014; Terra y Ferreira, 1994). Esto podría constituir una razón por la que a veces la protoxina no se solubiliza, traduciéndose en una baja susceptibilidad a *B. thuringiensis* (de Maagd *et al.*, 2001).

Una vez que las protoxinas fueron solubilizadas, estas son activadas posteriormente liberando el fragmento tóxico ( $\delta$ -endotoxina) de 55 a 60 kDa. Este procesamiento se produce por la acción de diferentes clases de proteasas presentes en el intestino del insecto, aunque se describió también la intervención de proteasas asociadas al cristal o de un cierto nivel de proteólisis espontánea (Cannon, 1996). El perfil de tipo de proteasas presentes también jugaría un rol importante en la resistencia o baja susceptibilidad frente a *B. thuringiensis* (López-Pazos *et al.*, 2010; Loseva *et al.*, 2002). Las serina proteasas (por ej. tripsina y quimotripsina) son las más importantes en lepidópteros, mientras que también lo pueden ser en algunas especies de coleópteros (Sharifi *et al.*, 2012). Sin embargo, en coleópteros las cisteína proteasas son en general las predominantes (Oppert *et al.*, 2003).

Las proteínas en su forma monomérica se unen a dos receptores en una interacción de baja afinidad (fosfatasa alcalina (ALP) y aminopeptidasa N (APN)) (Pardo-López *et al.*, 2013). Estos receptores son proteínas muy abundantes y se encuentran ancladas a la membrana por un glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Upadhyay y Singh, 2011). La unión a ALP y APN permite la concentración de una gran cantidad de toxinas en la membrana apical de las células epiteliales del intestino medio, donde se une fuertemente a proteínas similares a caderina (CAD) (Pardo-López *et al.*, 2013). En coleópteros, se conoce que Cry3Aa es capaz de unirse a una metaloproteasa en *Leptinotarsa decemlineata* (Ochoa-Campuzano *et al.*, 2007), y a una CAD y ALP en *Tenebrio molitor* (Fabrick *et al.*, 2009; Zúñiga-Navarrete *et al.*, 2013), mientras que Cry7Ab3 se une a CAD en *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Song *et al.*, 2012). Además, un gen que codifica CAD se identificó en *Diabrotica virgifera virgifera* (Sayed *et al.*, 2007). Otro tipo de receptores encontrados son una ALP en *Anthonomus grandis* para Cry1B (Martins *et al.*, 2010), una  $\beta$ -glucosidasa en *P. japonica* para Cry8Da (Yamaguchi *et al.*, 2013), y un *sodium solute symporter* junto a una CAD en *Tribolium castaneum* para Cry3Ba (Contreras *et al.*, 2013). Hua *et al.* (2014) identificaron el primer receptor para Cry3Bb en *A. diaperinus*, una CAD de ca. 185 kDa (AdCad1).

Posteriormente, se induce un cambio conformacional en la proteína Cry monomérica que promueve la escisión del extremo N-terminal incluyendo la hélice  $\alpha$ -1 del dominio I de la toxina por una proteasa de membrana. Este clivaje facilita la formación de una estructura

oligomérica pre-poro, en la que varias moléculas de la proteína Cry interactúan para formarlas (Pardo-López *et al.*, 2013). Esta se une a una molécula de APN y ALP, a través de una interacción de alta afinidad, que la transportaría hacia zonas específicas de la membrana donde se inserta a través del dominio I formando un poro (Pardo-López *et al.*, 2013). La formación de este oligómero antes de su inserción en la membrana se demostró para toxinas Cry3A en los coleópteros *L. decemlineata* y *T. molitor* (Fabrick *et al.* 2009; Rausell *et al.*, 2004). En la figura 4 se muestra una representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios que se da en lepidópteros y que comparte grandes similitudes con lo que ocurriría en coleópteros.



**Fig. 4.** Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios en lepidópteros. Adaptado de Pardo-Lopez *et al.*, 2013.

Las células se hacen permeables a iones pequeños y otras moléculas como consecuencia de la formación del poro. Estas se hinchan debido al desbalance osmótico y finalmente ocurre la lisis celular (Pardo-López *et al.*, 2013). La disrupción del epitelio del intestino medio hace que la larva deje de alimentarse y muera por desnutrición. Este proceso se vería acelerado debido a la entrada de esporas a la hemolinfa, donde encontrarían un lugar favorable para la germinación y reproducción (Schnepf *et al.*, 1998).

Un modelo alternativo de mecanismo de acción fue expuesto por Zhang *et al.* (2006). En este modelo se propuso que la unión al receptor de CAD desencadenaría una vía intracelular que resultaría en la activación de una proteína G con la posterior activación de la adenilato

ciclasa, aumentando niveles de AMPc y la activación de una proteína quinasa A, que a su vez conduciría a la muerte celular sin la participación del oligómero de la toxina, de la formación de poros y sin la participación de otros receptores tales como proteínas ancladas a GPI.

Por otra parte, Broderick *et al.* (2006 y 2009) sugirieron que la mortalidad sería sólo inducida por *B. thuringiensis* y que dependería esencialmente de bacterias que forman parte de la microbiota del intestino medio del insecto huésped como responsables reales. No obstante, este planteamiento es muy discutible y controversial. Otro grupo de investigación confirmó más recientemente que la presencia de *B. thuringiensis* es suficiente para producir la muerte de la larva y que lo puede lograr en ausencia de su microbiota intestinal (van Frankenhuyzen *et al.*, 2010).

### **1.7. Patogenicidad de *B. thuringiensis* para insectos coleópteros.**

La patogenicidad de *B. thuringiensis* se da a nivel de varios taxones de invertebrados, principalmente aquellos pertenecientes a la Clase Insecta. Dentro del Orden Coleoptera, las familias con susceptibilidad probada incluyen: Bostrichidae, Coccinellidae, Curculionidae, Chrysomelidae, Dermestidae, Elateridae, Tenebrionidae, Scolytidae y Scarabeidae (Glare y O'Callaghan, 2000; Méndez-López *et al.*, 2003).

Una cepa patógena para coleópteros, designada "*B. thuringiensis* var. *san diego*" fue comunicada por Herrnstadt *et al.* (1986) como productora de una proteína de ca. 60 kDa tóxica para algunos coleópteros: *Phyrrhalla luteola*, *Anthonomus grandis*, *Tenebrio molitor* entre otros. La secuencia nucleotídica que codifica esa toxina fue reportada al año siguiente (Herrnstadt *et al.*, 1987). Esta secuencia de la cepa "*B. thuringiensis* var. *san diego*" resultó idéntica a la obtenida por Sekar *et al.* (1987) para la cepa "*B. thuringiensis* var. *tenebrionis*". Ese mismo año, Krieg *et al.* (1987) demostró que ambas cepas serían idénticas. Actualmente las dos cepas se clasifican dentro del serovar *morrisoni*, denominándose *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *san diego* y *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* respectivamente. Por otra parte, cepas de *B. thuringiensis* svar. *israelensis*, mosquitocida por excelencia, mostraron cierto nivel de toxicidad para especies de coleópteros: *Hypothenemus hampei* (Méndez-López *et al.*, 2003), *Epilachna paenulata* (Sauka *et al.*, 2010a) y *Anthonomus grandis* (Monnerat *et al.*, 2012).

Las cepas de *B. thuringiensis* difieren en su toxicidad frente a determinadas especies de insectos y en la potencia relativa de sus toxinas hacia las especies susceptibles. Cuando se

comparan relativamente los niveles de patogenicidad producidos por cepas de *B. thuringiensis* activas contra coleópteros frente a los de cepas consideradas tóxicas para dípteros o lepidópteros, la realidad demuestra que son significativamente más bajos (Glare y O'Callaghan, 2000). Esto se cree que podría deberse al ambiente neutro a ácido que en general existe en el interior del intestino medio de los coleópteros, lo que dificultaría la solubilización de los cristales (de Maagd *et al.*, 2001), y/o la posterior activación de la toxina (Sharifi *et al.*, 2012).

Resumidamente, podemos mencionar que son al menos tres los factores principales que influirían sobre la potencia relativa o especificidad de los cristales de *B. thuringiensis* (Bravo *et al.*, 2004; Carroll *et al.*, 1997): el origen de la toxina, que implica conocer de que cepa de *B. thuringiensis* proviene; el grado de solubilidad de los cristales en los jugos intestinales del huésped; la presencia de las enzimas apropiadas para la activación de la protoxina y la susceptibilidad intrínseca del huésped a la toxina, que estaría dada por la presencia de receptores específicos en las células epiteliales del intestino medio del mismo.

### **1.8. Bioinsecticidas y plantas transgénicas para el manejo de coleópteros plagas.**

La acción insecticida de *B. thuringiensis* se puede presentar bajo una serie de productos conocidos como bioinsecticidas de primera, segunda y tercera generación (Tabla 1), así como de las llamadas plantas transgénicas Bt que se utilizan para el manejo de insectos plagas.

Un número elevado de formulaciones a base de *B. thuringiensis* se encuentran registradas en todo el mundo. En nuestro país, desde la década del '80 se han efectuado estudios sobre producción de esta clase de bioinsecticidas empleando distintas cepas de *B. thuringiensis*, focalizándose en el diseño y formulación de medios de cultivo y optimización de procesos fermentativos (Arcas, 1985; Benintende *et al.*, 2005; Ertola, 1987; Faloci *et al.*, 1990; Monella *et al.*, 2007). Algunas empresas privadas locales registraron productos de origen nacional destinados al control de orugas defoliadoras y también de larvas de mosquitos, los que se suman a productos de importación (Sauka y Benintende, 2008).

**Tabla 1.** Características principales de los bioinsecticidas que poseen *B. thuringiensis* como ingrediente activo (Sauka *et al.*, 2013).

Bioinsecticidas	Características principales de las formulaciones
<b>Primera generación</b>	Mezcla de cristales y esporas de <i>B. thuringiensis</i> como ingrediente activo. Especificidad restringida a ciertos órdenes de insectos. Potencia relativamente baja y toxicidad residual corta. Constituyen la mayor proporción de los productos comerciales disponibles mundialmente.
<b>Segunda generación</b>	Mezcla de cristales y esporas de <i>B. thuringiensis</i> a la cual se le introdujo genes que codifican $\delta$ -endotoxinas presentes en otros <i>B. thuringiensis</i> . Espectro de actividad ampliado o toxicidad incrementada mediante un efecto sinérgico o aditivo.
<b>Tercera generación</b>	Contiene bacterias recombinantes que fueron modificadas genéticamente con genes <i>cry</i> de <i>B. thuringiensis</i> , o esta misma bacteria modificada con otros genes que codifiquen para otros factores de virulencia distintos a las $\delta$ -endotoxinas. Toxicidad residual aumentada o espectro de actividad ampliado.

Solo dos productos comerciales registrados para el manejo de coleópteros plagas existen a nivel mundial, formulados con *B. thuringiensis* *svar. morrisoni* cepa *tenebrionis* como ingrediente activo: Novodor™ y Trident™ (Srinivasa Rao *et al.*, 2015). De acuerdo a nuestro conocimiento, en la actualidad no existen en nuestro país productos registrados para su comercialización a base de *B. thuringiensis* con actividad tóxica para coleópteros.

En lo que respecta a las plantas transgénicas Bt, han tenido un gran desarrollo gracias a los avances en la ingeniería genética. El empleo de este tipo de plantas posee la ventaja de reducir la necesidad de aplicación de insecticidas, de proveer una protección duradera a lo largo de la temporada de cultivo y de que los únicos insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentándose de las plantas y no otros insectos (Ahmad *et al.*, 2012). Por otro lado, las plantas Bt poseen la gran desventaja que radica en la posible generación de resistencia en ciertas poblaciones naturales de insectos que se alimentan de ellas (Tabashnik *et al.*, 2013).

En los EE.UU están registrados seis eventos de plantas transgénicas Bt para el manejo de diversos coleópteros que afectan cultivos de importancia económica (Tabla 2) (United States Environmental Protection Agency, 2016). Actualmente en nuestro país no existe ningún registro de planta Bt destinada al manejo de coleópteros.

**Tabla 2.** Eventos transgénicos Bt registrados en EE.UU para el manejo de coleópteros plagas.

Gen/genes	Evento	Cultivo	Año de registro
<i>cry34/cry35</i>	Cry34/35 in event 59122-7 (PC code: 006490)	Maíz	2005
<i>cry3A</i>	Cry3A in New Leaf Potato (PC code: 006432)	Papa	1995
<i>cry3Bb1</i>	Cry3Bb1 in event MON 87411 (PC code: 006580)	Maíz	2015
<i>cry3Bb1</i>	Cry3Bb1 in event MON 88017(PC code: 006498)	Maíz	2005
<i>ecry3.1Ab</i> <sup>1</sup>	eCry3.1Ab in event 5307 (PC code: 016483)	Maíz	2012
<i>mcry3A</i> <sup>2</sup>	mCry3A in Event MIR 604 (PC code: 006509)	Maíz	2006

<sup>1</sup> Proteína quimera generada por ingeniería genética. <sup>2</sup> Proteína modificada.

## **2. Coléopteros plaga de importancia en el Sector Agropecuario.**

### **2.1. *Anthonomus grandis*: el picudo del algodón.**

El cultivo del algodón tiene en nuestro país una importancia relevante, tanto en aspectos económicos como sociales, generando empleo y valor agregado a la cadena agroindustrial. La superficie sembrada en todo el país durante la campaña 2015/2016 fue de 401.360 ha según datos del Ministerio de Agricultura (MinAgri, 2016). El ecosistema algodónero presenta serios problemas en el control de artrópodos plagas debido a situaciones generadas por aplicación inadecuada e indiscriminada de insecticidas químicos, sumado a la

presencia sostenida año tras año, del picudo del algodónero. *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es considerado una de las plagas más importantes del cultivo de algodón en todo el mundo, tanto por los daños que causa como por las dificultades para su manejo, en la región norte de Argentina y otras regiones del continente americano (Bonacic Kresic *et al.*, 2010; de Lima *et al.*, 2013; Ramalho y Wanderley, 1996).

Con lo que respecta a la biología de la especie, en condiciones naturales su ciclo biológico consta de 18 a 22 días, pasando por una metamorfosis completa (Rodríguez *et al.*, 2014) (Fig. 5).



**Fig. 5.** Ciclo de vida de *A. grandis*. Tiene una duración entre 18 a 22 días. Una vez que las larvas emergen pasan por 3 estadios, luego de los cuales empupan y aproximadamente a la semana emerge el adulto. Las hembras a los pocos días alcanzan la madurez sexual y depositan los huevos dentro de los botones florales.

- Huevos: son de color blanco nacarado con forma elíptica. Su tamaño es de 0,8 mm de largo y 0,5 mm de ancho.
- Larvas: presentan forma de C, ápodas, cilíndricas, curvadas y de cuero corrugado. Es de color blanco a excepción de la cabeza que es de color oscuro. Al salir del huevo mide 1 mm y alcanza los 6 mm, en su tercer y último estadio o muda. Antes de que se forma la pupa, las larvas disminuyen su actividad y dejan de alimentarse, estado conocido como prepupa.

- Pupas: Es de color blanco crema y sin cobertura, lo que permite distinguir el pico descansando sobre la parte ventral del cuerpo. Son de 6 mm de largo por 3 mm de ancho aproximadamente.
- Adultos: miden de 3 a 8 mm de largo, la mitad de esta longitud corresponde al pico o rostro y de 3 a 4 mm el ancho del cuerpo. El pico o rostro es curvado, largo y delgado. Posee un par de antenas geniculadas. El aparato bucal es de tipo masticador, localizado en el extremo del pico. Las mandíbulas sirven para cortar y rasgar y el movimiento de rotación del pico funciona como un taladro. Presentan élitros que poseen surcos longitudinales, cubiertos por pelos cortos. El color varía de pardo rojizo a castaño oscuro.

Pueden pasar por un estado fisiológico de reposo denominado diapausa. Se caracteriza por una paralización del sistema reproductivo, aumento en el contenido de grasas, reducción del contenido de agua y reducción de la respiración. Un insecto normal vive un promedio de no más de 50 días. Un adulto que entró en diapausa puede sobrepasar 130 días sin alimentarse durante ese período (Bonacic Kresic *et al.*, 2010).

Esta plaga produce daños de dos tipos en los cultivos de algodón: por alimentación y por oviposición. Los adultos, hembras y machos, perforan botones florales y bellotas para alimentarse; la hembra después del periodo de pre-oviposición realiza una perforación con las mandíbulas y coloca sus huevos dentro de botones florales o cuando éstos escasean deposita sus huevos en bellotas recién formadas. Posteriormente tapa el orificio con una sustancia pegajosa de color blanco lechoso, secretada por las glándulas accesorias (Alonso, 1983; Norato, 2005). No obstante, el daño económico lo efectúa el estadio larvario al alimentarse de las anteras, polen o fibra de las semillas en formación (Ávila y Terán, 1993; Martínez *et al.*, 2002). Los botones florales dañados y bellotas pequeñas, se caen y las bellotas grandes permanecen en la planta, pero su calidad se ve afectada.

Su manejo se basa en el uso de insecticidas químicos de tipo organofosforados y piretroides (Fogar *et al.*, 2015). La importancia del empleo del control químico radica en mantener al picudo a niveles donde no cause daños económicos. Sus aplicaciones por focos se efectúan para retrasar las aplicaciones generalizadas de insecticidas, por lo menos hasta 70 y 80 días después de la siembra de un lote.

A su vez existen prácticas preventivas de tipo cultural, como ser períodos cortos de siembra y eliminación de focos y hospederos. Y prácticas etológicas, con el uso de trampas de feromonas y tubos mata picudos. Estas trampas son eficientes para atraer y/o detectar

picudos al inicio y fin del ciclo del cultivo, cuando hay menos competencia con picudos machos en el campo (Bonacic Kresic *et al.*, 2010).

En lo que respecta al control biológico, se han encontrado aislamientos de hongos y bacterias entomopatógenas tóxicas para *A. grandis* con potencialidad para ser formulados como bioinsecticidas o alguno de sus genes como parte de una planta Bt (Monnerat *et al.*, 2012; Nussenbaum, 2014). Como fruto de alguna de estas investigaciones, se comunicó recientemente el desarrollo a nivel experimental de plantas transgénicas de algodón productoras de Cry1Ia de la cepa S1451 y Cry1Ia12, ambas destinadas al manejo de *Spodoptera frugiperda* y *A. grandis* (Silva *et al.*, 2015; de Oliveira *et al.*, 2016).

### **2.2. *Alphitobius diaperinus*: el escarabajo de la cama de pollos.**

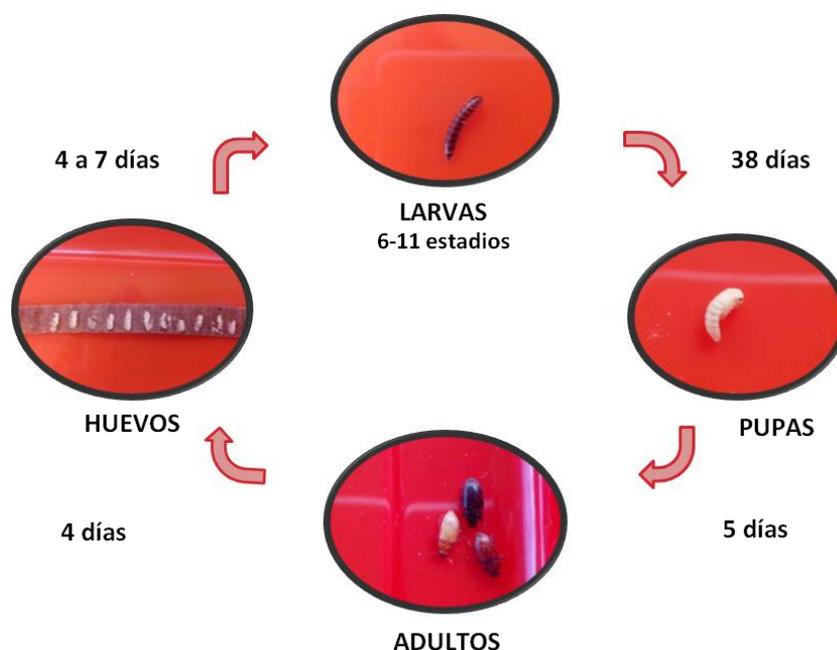
Uno de los problemas que afecta a las explotaciones avícolas es la presencia de escarabajo de la cama de pollos, *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera: Tenebrionidae). Este coleóptero es considerado una plaga endémica de distribución mundial en granjas avícolas, que con los años aumenta la severidad de las infestaciones (Hosen *et al.*, 2004).

Los escarabajos adultos pueden vivir entre 3 y 12 meses. Un escarabajo hembra tiene el potencial de producir hasta 2.000 huevos después del apareamiento (Cecco *et al.*, 2005). Los suele depositar en las fisuras, grietas y material aislante de las granjas avícolas. Estas larvas eclosionan entre los 4 y los 7 días y completan el desarrollo a la fase adulta entre 40 y 100 días, dependiendo de la calidad de alimentos y la temperatura. En condiciones de laboratorio el ciclo dura aproximadamente 55 días (da Silva, *et al.* 2005).

Existen de 6 a 11 estadios larvales, dependiendo de las condiciones ambientales, siendo el desarrollo óptimo entre 30 y 33°C con 90% de humedad relativa (Francisco y do Prado, 2001) (Fig. 6).

- Huevo: es de color blanquecino o marrón, de un largo de alrededor de 0,5 a 0,7 mm
- Larva: llega a medir 11 mm en su etapa final. Presenta un número de estadios entre 6 y 11 estadios larvales dependiendo de las condiciones ambientales. La larva presenta un aspecto blanquecino al salir del huevo, que va oscureciéndose hasta alcanzar un color marrón. En estadios larvales avanzados se observa un cuerpo estrecho y segmentado.
- Pupa: son de color blanco cremoso. Llegan a medir entre 2,2 y 2,5 mm de largo.

- Adulto: de hasta 6 mm de longitud y forma oval. Presentan un color negro brillante con élitros de color marrón rojizo, variable entre individuos y edad.



**Fig. 6.** Ciclo de vida de *A. diaperinus*. En condiciones de laboratorio tiene una duración aproximada de 55 días. Presenta una metamorfosis completa pasando por huevo, larvas que presentan entre 6 a 11 estadios larvales, pupa y adulto.

La acción dañina de *A. diaperinus* se puede clasificar en cuatro aspectos principales (Cecco *et al.* 2005):

- Acción sobre las instalaciones: las larvas perforan los materiales de aislamiento, buscando un sitio para empupar. También destruyen las estructuras de madera y erosionan las juntas de cemento (Despin *et al.*, 1987; O'Connor, 1987).
- Efectos traumáticos en las aves: ejerce acción mecánica sobre las aves produciéndoles lesiones que son la puerta de entrada de patógenos y estrés por irritación. De esa manera no se alimentan ni descansan lo suficiente, por lo que las aves crecen menos y aumenta la tasa de mortalidad.
- Vector de patógenos: es hospedador intermediario de múltiples parásitos intestinales. Transmite enfermedades aviares producidas por virus, bacterias, hongos, protozoos e incluso nemátodos tales como: leucosis y viruela aviar, enfermedad de Marek y de

Newcastle, clostridiosis, aspergilosis, coccidiosis por *Eimeria* spp., lesiones por *Hadjelia truncata*. Además pueden funcionar como reservorios de patógenos transmisibles por alimentos al humano (por ej. *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp. y *Escherichia coli*) (McAllister *et al.*, 1996; Segabinazi *et al.*, 2005).

- Efecto sobre los trabajadores de la granja: producen alergias. Los escarabajos de la familia Tenebrionidae, incluyendo *A. diaperinus*, producen benzoquinonas. La exposición a vapores de quinonas también puede resultar en conjuntivitis y ulceración de la córnea. También incluyen afecciones que tienen como síntomas asma, dolores de cabeza, dermatitis, angioedema, rinitis alérgica, eritema (enrojecimiento), y la formación de pápulas (Schroeckenstein *et al.*, 1989).

La mayoría de las estrategias para el manejo de esta plaga se basan en la aplicación de insecticidas químicos, que al igual que para el picudo del algodnero, son del tipo organofosforados y piretroides (Geden y Hogsette, 1994; Salin *et al.*, 2003). Su uso y eficacia son limitados por la continua presencia de aves en las granjas, por el hábito de los insectos que quedan por debajo de la superficie y por la posible resistencia de algunos de los insecticidas del mercado actual.

La combinación de un insecticida adulticida (piretroide) y un insecticida larvicida (regulador de crecimiento) mostró un excelente control de los escarabajos adultos y larvas (Salin *et al.*, 2003). Con ellos se tratan los galpones durante el período de vacío sanitario cuando los animales no están presentes y antes de la entrada del ciclo nuevo de producción. Durante ese período, sin la temperatura adecuada ni materia orgánica, los escarabajos se inactivan y se esconden en las estructuras del galpón a la espera de un ciclo nuevo de producción, encontrándose fuera del alcance de los insecticidas. Estos productos pueden causar intoxicaciones en operarios y aves, y seleccionar insectos resistentes. Por eso, la implementación de bioinsumos para el control biológico de *A. diaperinus* constituiría una alternativa complementaria que se podría aplicar durante toda la etapa de producción sin riesgos para las aves ni operarios.

Se hicieron también intentos para seleccionar aislamientos de hongos, nemátodos y bacterias entomopatógenas tóxicas para *A. diaperinus* con potencialidad para ser incluidos como ingredientes activos de bioinsecticidas, sin mayor éxito (Alvez *et al.*, 2005; Gazoni *et al.*, 2012; Geden y Steinkraus, 2003; Rodríguez *et al.*, 2011). No existen hasta el momento bioinsumos formulados con *B. thuringiensis* destinados al manejo de *A. diaperinus*.



# *Objetivos e hipótesis*



### **Objetivo general:**

El objetivo general de este trabajo es determinar factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis* y su utilización, para aportar al desarrollo de tecnologías destinadas al control de plagas coleópteras que inciden en el Sector Agropecuario. De esta manera se estaría reduciendo el uso de agroquímicos, mejorando la calidad de vida de los trabajadores rurales y favoreciendo la conservación de los recursos naturales.

### **Objetivos específicos:**

- Establecer una cría masiva del escarabajo de la cama de pollos bajo condiciones de laboratorio considerando las necesidades biológicas de la especie.
- Evaluar el potencial patogénico de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* en *Anthonomus grandis* y en *Alphitobius diaperinus*, y seleccionar las más virulentas.
- Caracterizar fenotípica y genotípicamente las cepas seleccionadas.
- Identificar los factores de virulencia potencialmente responsables de la actividad tóxica.
- Evaluar la virulencia de cepas tóxicas para *A. diaperinus* mediante ensayos de concentración letal media.
- Mejorar un medio de cultivo líquido para lograr una mayor producción de biomasa activa.

### **Hipótesis:**

- La implementación de ensayos toxicológicos permitirá seleccionar cepas de *B. thuringiensis* con patogenicidad para *A. grandis* y *A. diaperinus*.
- La caracterización fenotípica y genotípica de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas permitirá determinar los factores de virulencia responsables de la mortalidad.
- Algunas de estas cepas podrían ser utilizadas como base de formulaciones de nuevos bioinsecticidas o sus genes que codifican factores de virulencia, ser utilizados en la transformación genética de cultivos.
- Es factible mejorar la producción de proteínas insecticidas de una cepa de *B. thuringiensis* en particular a través de la optimización de los componentes de un medio de cultivo líquido apropiado.



# *Materialles y métodos*



## Materiales y métodos

### 1. Cepas de *Bacillus thuringiensis* empleadas en este estudio.

Se utilizaron en este trabajo cepas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección del Laboratorio Insumos Bacterianos (IMyZA-INTA), conformada por más de 500 “ingresos” entre cepas exóticas y nativas. El estudio se realizó utilizando 103 cepas nativas diferentes, obtenidas de muestras de suelo, residuos de molienda de granos, filoplano de plantas, larvas de insectos y telarañas, de diferentes regiones de Argentina (Tabla 3).

**Tabla 3.** Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en diferentes etapas del estudio.

<b>Cepa de <i>B. thuringiensis</i></b>	<b>Origen</b>	<b>Provincia</b>	<b>Invertebrado<sup>1</sup></b>	<b>Sección<sup>2</sup></b>
INTA 3-1	Suelo	Entre Ríos	L y D	1
INTA 7-3	Suelo	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA 33-5	Suelo	Misiones	C	1 y 2
INTA 50-4	Suelo	Jujuy	L y D	1
INTA 50-6	Suelo	Jujuy	C	1
INTA 51-3	Suelo	Salta	C	1 y 2
INTA 54-8	Suelo	Salta	L y D	1
INTA 56-4	Suelo	Salta	L y D	1 y 2
INTA 77-10	Suelo	Entre Ríos	Ni L, D, C o Ne	2
INTA 78-2	Suelo	Buenos Aires	L y D	1
INTA 79-37	Suelo	Buenos Aires	L y D	1
INTA 79-38	Suelo	Buenos Aires	L y D	1
INTA 103-23	Suelo	Santa Fe	Ni L o D	1
INTA 180-12	Suelo	Misiones	ND	1
INTA 186-1	Suelo	Salta	ND	1
INTA 186-5	Suelo	Salta	ND	1
INTA 186-16	Suelo	Salta	ND	1

## Materiales y métodos

INTA186-35	Suelo	Salta	ND	1
INTA 194-9	Suelo	Santa Fe	ND	1
INTA 272-1	Suelo	Entre Ríos	ND	2
INTA L1-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA L2-1	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA L14-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA Ep-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA Ep-3	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA Ep-5	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA Ep-6	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA VO3	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	1
INTA Mo1-10	Molienda de granos	Buenos Aires	L	1
INTA Mo1-12	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA Mo4-4	Molienda de granos	Buenos Aires	C	1 y 2
INTA Mo4-6	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo5-8	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo8-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo8-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo9-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo9-5	Molienda de granos	Buenos Aires	L	1
INTA Mo14-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA Mo14-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo14-3	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo14-4	Molienda de granos	Buenos Aires	Ne	1 y 2
INTA Mo15-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo21-1	Molienda de granos	Buenos Aires	Ni L, D, C o Ne	1
INTA Mo22-4	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo22-3	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo26-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo27-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo28-4	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1

INTA Mo29-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Mo32-3	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Fo3-2	Suelo	Entre Ríos	L y D	1
INTA Fr7-4	Suelo	Misiones	L y C	1 y 2
INTA Fr8-1	Suelo	Misiones	C	1
INTA TA1-2	Telaraña	Buenos Aires	L y D	1
INTA TA1-11	Telaraña	Buenos Aires	L y D	1
INTA TA1-13	Telaraña	Buenos Aires	L y D	1
INTA TA20-6	Telaraña	Entre Ríos	L y D	1
INTA TA21-2	Telaraña	Entre Ríos	L y D	1 y 2
INTA TA24-2	Telaraña	Entre Ríos	L y D	1
INTA TA24-6	Telaraña	Entre Ríos	L	1
INTA TA24-10	Telaraña	Entre Ríos	L y D	1
INTA TA273-8	Telaraña	Entre Ríos	ND	2
INTA H1-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H1-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H2-1	Filoplano	Buenos Aires	C	1
INTA H2-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H2-12	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H3-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H3-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA H3-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H4-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA H4-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1 y 2
INTA H5-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H5-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H6-2	Filoplano	Buenos Aires	C	1
INTA H6-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H7-2	Filoplano	Buenos Aires	Ni L, D, C o Ne	1
INTA H7-3	Filoplano	Buenos Aires	L	1
INTA H11-2	Filoplano	Buenos Aires	Ni L, D, C o Ne	1

INTA H11-4	Filoplano	Buenos Aires	Ni L, D, C o Ne	1
INTA H12-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H13-5	Filoplano	Tucumán	L	1
INTA H14-1	Filoplano	Tucumán	L y D	1
INTA H17-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H22-2	Filoplano	Buenos Aires	Ni L o D	1
INTA H22-7	Filoplano	Buenos Aires	Ni L o D	1
INTA H25-2	Filoplano	Catamarca	Ni L, D, C o Ne	1
INTA 27-3	Filoplano	Catamarca	ND	1
INTA H41-1	Filoplano	Buenos Aires	D y C	1 y 2
INTA H42-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H45-4	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1
INTA H46-3	Filoplano	Entre Ríos	C	1
INTA H46-12	Filoplano	Entre Ríos	L y D	1
INTA H46-18	Filoplano	Entre Ríos	L y D	1
INTA H47-2	Filoplano	Entre Ríos	L y D	1
INTA H47-3	Filoplano	Entre Ríos	C	1
INTA H48-5	Filoplano	Entre Ríos	L, D y Ne	1 y 2
INTA H48-8	Filoplano	Entre Ríos	L y D	1
INTA 48-12	Filoplano	Entre Ríos	Ni L, D, C o Ne	1
INTA H48-34	Filoplano	Entre Ríos	L y D	1
INTA Pol49-1	Molienda de granos	Buenos Aires	C	1
INTA Pol49-6	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	1
INTA Pol-49-14	Molienda de granos	Buenos Aires	ND	1

<sup>1</sup> Invertebrado blanco con susceptibilidad probada en *B. thuringiensis*. L: *Anticarsia gemmatalis* y/o *Crociosema aporema* (Lepidoptera); D: *Aedes aegypti* (Diptera); C: *Epilachna paenulata* (Coleoptera); Ne: *Panagrellus redivivus* (Nematoda); ND: No determinado. <sup>2</sup> Sección o secciones en las cuales la cepa es estudiada.

Por otra parte, se utilizaron también 28 cepas pertenecientes a distintas serovariedades de *B. thuringiensis* provenientes de colecciones internacionales (Tabla 4).

**Tabla 4.** Cepas exóticas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en diferentes etapas del estudio.

Cepa-serovar	Origen <sup>1</sup>	Sección <sup>2</sup>	Cepa-serovar	Origen <sup>1</sup>	Sección <sup>2</sup>
<i>aizawai</i> HD-133	USDA	2	<i>kyushuensis</i> HD-541	BGSC	1 y 2
<i>aizawai</i> HD-137	USDA	1	<i>morrisoni</i> 4K3	BGSC	2
<i>alesti</i> HD-4	USDA	1 y 2	<i>morrisoni</i> HD12	BGSC	1 y 2
<i>asturiensis</i> 4BQ1	BGSC	1 y 2	<i>morrisoni</i> 4AB1	BGSC	1
<i>canadensis</i> HD-224	BGSC	1 y 2	<i>pakistani</i> 4P1	BGSC	1 y 2
<i>entomocidus</i> HD-110	BGSC	1 y 2	<i>roskildiensis</i> T45001	BGSC	1 y 2
<i>galleriae</i> T05001	IP	1 y 2	<i>sotto</i> HD-6	USDA	1
<i>israelensis</i> HD-567	USDA	2	<i>morrisoni tenebrionis</i> DSM2803	CINVESTAV	1 y 2
<i>israelensis</i> IPS-82	CINVESTAV	1 y 2	<i>thompsoni</i> HD-542	USDA	1 y 2
<i>japonensis</i> 4AT1	BGSC	1 y 2	<i>thuringiensis</i> HD-2	USDA	1 y 2
<i>kenyae</i> HD-5	USDA	1	<i>tochigiensis</i> 4Y1	BGSC	1 y 2
<i>kumamotoensis</i> 4W1	BGSC	1 y 2	<i>tolworthi</i> HD-125	USDA	1 y 2
<i>kurstaki</i> HD-1	USDA	1 y 2	<i>toumanoffi</i> HD-201	BGSC	1 y 2
<i>kurstaki</i> HD-73	USDA	2	<i>wuhanensis</i> HD-525	BGSC	1 y 2

<sup>1</sup> BGSC, Bacillus Genetic Stock Center; CINVESTAV, Centro de Investigación y Estudios Avanzados; IP, Instituto Pasteur; USDA, United States Department of Agriculture. <sup>2</sup> Sección o secciones en las cuales la cepa es estudiada.

## **2. Preparación de las cepas de *B. thuringiensis* utilizadas en los distintos ensayos.**

A partir de una suspensión stock de un complejo espora-cristal de las cepas a evaluar de *B. thuringiensis*, se tomaron 50 µl y se sembraron en 50 ml de caldo BM (NaCl, 2,5 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2,5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,25 g; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O, 0,2 g; glucosa, 5 g; extracto de levadura (Oxoid), 4 g; agua destilada c.s.p 1 litro. Ajustar el pH a 7,1-7,2 con NaOH), a 250 rpm y 29°C durante 72 h o hasta autólisis. Este caldo difiere del original por la ausencia de almidón soluble (Benintende y Cozzi, 1996). Las distintas fracciones de los cultivos completos (*pellet* y sobrenadante) se obtuvieron mediante centrifugación a 10.000 xg (Thermo scientific Sorvall RC 6+) a 4°C durante 20 min. Al *pellet* se le realizaron tres lavados por centrifugación

con agua desionizada estéril. Parte del *pellet* se resuspendió en 1/5 de su volumen en agua desionizada estéril mientras que otra se dejó secar en una estufa de circulación forzada (San Jor H701P) a 30°C durante 96 h. Cuando el *pellet* estuvo seco, se procedió a molerlo homogéneamente en un mortero.

El sobrenadante fue recolectado y filtrado a través de filtros de poro de 0,2 µm. Parte de él, fue sometido a un ciclo de esterilización por calor húmedo a presión superior a la normal en autoclave (121°C durante 15 min).

Alícuotas de cultivos completos y todas las fracciones obtenidas (*pellet* resuspendido, *pellet* seco y molido, sobrenadante filtrado y sobrenadante filtrado y autoclavado) fueron conservadas en freezer a -20°C hasta su uso.

### **3. Ensayos biológicos de toxicidad.**

Los bioensayos de *B. thuringiensis* realizados con *A. grandis* y *A. diaperinus* se dividieron en “burdos” y “finos”. Los primeros se realizaron para llevar a cabo un tamizaje en búsqueda de las cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* más tóxicas, y para determinar en aquellas seleccionadas la fracción del cultivo en la cual se hallaban los metabolitos activos. A su vez para *A. grandis* se realizaron ensayos con sobrenadante estéril autoclavado para determinar la presencia de metabolitos termolábiles en el sobrenadante, tóxicos para dicho coleóptero. En los segundos se evaluó una cepa seleccionada de *B. thuringiensis*, y los cristales de la misma fueron sometidos a una solubilización y tripsinización *in vitro*, determinando a través de la CL<sub>50</sub>, la virulencia para *A. diaperinus* en cada caso. Todos los bioensayos se realizaron por el método de incorporación en dieta utilizando placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc 143982). Las larvas de *A. grandis* empleadas en los bioensayos se obtuvieron del Laboratorio de Cría del Picudo del Algodonero del IMyZA-INTA, Castelar, Buenos Aires. Por otro lado, las larvas de *A. diaperinus* se obtuvieron de una cría del escarabajo de la cama de pollos establecida en el laboratorio específicamente para este trabajo.

#### **3.1. Bioensayos “burdos”.**

El procedimiento para llevarlos a cabo fue el siguiente:

1) Se preparó la dieta larval para *A. grandis* (Pharmamedia®, 33,3 g; germen de trigo, 50 g; harina de soja, 83,3 g; levadura en polvo (Calsa), 50 g; azúcar común (Ledesma), 50 g; agar-

agar (Oxoid), 10 g; agua desionizada c.s.p. 1 litro), y para *A. diaperinus* (alimento balanceado para pollo (Ganave), 133,3 g; agar-agar (Oxoid), 10 g; agua desionizada c.s.p. 1 litro). Estas preparaciones se esterilizaron por calor húmedo a presión superior a la normal en autoclave (121°C durante 15 min). Luego se mantuvieron las dietas en baño de agua a 55°C. A continuación se agregaron distintas sustancias como conservantes: ácido ascórbico, 2,5 g/l; ácido sórbico, 1,25 g/l; nipagín, 2,08 g/l. La composición de ambas dietas fue establecida y optimizada en el laboratorio;

2) se utilizaron 4 y 6 ml de la preparación de cada cepa (cultivo completo, *pellet* resuspendido y sobrenadante filtrado) obtenidos de acuerdo a lo detallado en el ítem 2. Para *A. grandis* también se utilizaron 4 ml de sobrenadante filtrado y autoclavado. Todas las preparaciones se incorporaron a tubos cónicos con 36 y 34 ml de la dieta artificial termostatizada para *A. grandis* y *A. diaperinus* respectivamente. Se utilizó caldo BM estéril en los controles de mortalidad natural. Los volúmenes empleados equivalen al máximo que pudo ensayarse sin que la consistencia de la dieta artificial se vea alterada;

3) se fraccionaron 600 y 400 µl de las mezclas en cada pocillo de las placas. Se colocó una larva neonata de *A. grandis* y del 2º estadio de *A. diaperinus* con la ayuda de un pincel en cada uno de ellos. Se emplearon 24 larvas por cada tratamiento y se realizaron al menos 2 repeticiones de cada uno.

4) La mortalidad se registró luego de ser incubados a 29°C durante 7 d.

Los resultados fueron corregidos para restar la mortalidad natural con la fórmula de Schneider-Orelli's (1947). Los valores de las medias y el desvío estándar de las mortalidades ocasionadas por los distintos tratamientos y la comparación entre ellos, fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, 2014).

### 3.2. Bioensayos “finos”.

La virulencia del *pellet* seco y molido de la cepa seleccionada para *A. diaperinus*, y el efecto de la solubilización ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM pH 10,6) y tripsinización *in vitro* de las proteínas que constituyen los cristales del mismo (respetando las proporciones y condiciones de incubación establecidas en el ítem 6.2.), se determinó mediante la realización de ensayos para estimar la concentración letal media ( $\text{CL}_{50}$ ) utilizando la metodología de incorporación

en dieta. El procedimiento empleado fue esencialmente similar a lo detallado en el ítem anterior.

Se evaluaron seis concentraciones de cada preparación, incorporando un control de mortalidad natural al cual se le adicionó agua destilada. Las diferentes preparaciones del *pellet* seco y molido fueron vertidas en cada pocillo a una concentración final de entre 35 y 320  $\mu\text{g/ml}$  (factor de dilución= 0,65), la mortalidad se registró luego de incubar el ensayo a 29°C durante 15 d. Estos datos fueron sujetos a análisis Probit (Finney, 1971) utilizando el programa estadístico IBM SPSS Statistics (Versión 19), para finalmente estimar la  $CL_{50}$ . Los datos de al menos tres ensayos independientes realizados en días diferentes se consideraron para establecer el valor definitivo de  $CL_{50}$ . Se determinó el coeficiente de variación entre los mismos, el cual debe ser menor o igual al 20% para que ese valor sea considerado válido.

### **4. Detección cualitativa de $\beta$ -exotoxina.**

Con el fin de detectar cualitativamente la presencia de  $\beta$ -exotoxina en las cepas en estudio, se realizaron bioensayos con mosca doméstica (*Musca domestica*) siguiendo el “método para ensayos múltiples”. Se utilizó esta clase de insectos ya que la  $\beta$ -exotoxina genera efectos teratógenicos sobre las pupas de las moscas, impidiendo la emergencia de los adultos. Aquellas cepas que evidenciaron presencia de  $\beta$ -exotoxina en esta etapa fueron evaluadas a través de bioensayos siguiendo el “método estándar” a modo confirmatorio.

#### **4.1. Método para ensayos múltiples.**

- 1) Se prepararon tubos plásticos de 50 ml con 12 ml de agar nutritivo (Difco) en pico de flauta;
- 2) las cepas a evaluar se sembraron uniformemente en toda la superficie del agar y por triplicado. Los tubos fueron incubados a 29°C durante 72 h o hasta autólisis;
- 3) en cada tubo se colocaron 10 larvas del 3º estadio de mosca doméstica y se tapó utilizando una malla fina. Las larvas fueron provistas por el laboratorio de cría de mosca doméstica del IMyZA;
- 4) se incubaron a 29°C durante 8 d, en total oscuridad;
- 5) se cuantificó la cantidad de moscas emergidas. Con emergencias mayores al 80% se considera que la cepa probada no es productora de  $\beta$ -exotoxina;

Como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* HD-2 y como control negativo *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1.

### **4.2. Método estándar.**

- 1) Se humedeció un papel filtro Whatman # 1 de 90 mm de diámetro en una placa de Petri, con 1 ml de sobrenadante filtrado y autoclavado (ver ítem 2) y 1 ml de agua desionizada estéril;
- 2) se agregaron 10 larvas del 3º estadio de mosca doméstica;
- 3) las cajas se sellaron con cinta plástica y se incubaron a 28°C durante 8 d;
- 4) se realizaron tres repeticiones por cada cepa;
- 5) se cuantificó la cantidad de moscas emergidas. Con emergencias mayores al 80% se considera que la cepa probada no es productora de  $\beta$ -exotoxina;

Como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* HD-2 y como control negativo *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1.

## **5. Caracterización morfológica de los cristales.**

Para caracterizar la morfología de los cristales presentes en las cepas seleccionadas, se procedió a analizar el complejo spora-cristal a partir del *pellet* resuspendido en agua desionizada estéril mediante microscopía de contraste de fases. Se colocó una gota de la suspensión sobre un portaobjetos y se observó en un microscopio (Nikon eclipse E200) utilizando lente de inmersión (100x).

## **6. Materiales y metodologías para el análisis de proteínas.**

### **6.1. Electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida.**

Los componentes proteicos de los cristales presentes en las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas fueron analizados mediante electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a la técnica descrita por Sambrook *et al.* (1989). La mezcla de reacción se presenta en la tabla 5.

**Tabla 5.** Mezcla de reacción para geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Reactivos	Gel de concentración (5%)	Gel de separación (10%)
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Agua desionizada	2871	2690
Acrilamida/Bisacrilamida (29,2%/0,8%)	534	3300
Tris-HCl 1M, pH=8,7	-	3750
Tris-HCl 1M, pH=6,8	500	-
SDS 10%	40	100
Persulfato de amonio 10%	75	150
TEMED	5	10

Los *pellets* resuspendidos de las cepas en estudio se mezclaron en relación 1:1 con el buffer de desnaturalización 2x (Tris-HCl 25 mM pH 6,8;  $\beta$ -mercaptoetanol 1,28 M; azul de bromofenol 2,89 mM; SDS 0,138 M y glicerol 2,17 M) y se incubaron a 95°C durante 5 min. El marcador de peso molecular utilizado fue el “Broad Range Protein Molecular Weight Markers” (Promega). La corrida electroforética del gel se realizó a 60 V durante 1 h y posteriormente a 90 V durante 2 h, utilizando buffer de corrida 1x (Tris 0,05 M; glicina 0,38 M; SDS 0,02%; pH 8,8).

Una vez finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Comassie R-250 0,1 % durante 5 min. Luego el gel se destiñó con una solución de metanol-ácido acético (50 ml de metanol, 75 ml de ácido acético y 875 ml de agua desionizada).

## **6.2. Solubilización y tripsinización de cristales.**

El *pellet* resuspendido de la cepa seleccionada como tóxica para *A. diaperinus* se solubilizó en proporción 0,6:1,0 empleando tres soluciones diferentes ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  50 mM, pH 10,6; NaBr 3,3 M, pH 6,6; NaOH 0,1 M, pH 12,9). Luego de incubarse a 37°C toda la noche, las suspensiones fueron centrifugadas a 16.000 xg (Sigma 1-15 pk) y se descartó el material insoluble. Parte del material solubilizado fue digerido enzimáticamente en proporción 10:1 con tripsina 1 mg/ml (EC 3.4.21.4, Sigma, tipo IX de páncreas bovino). Después de 2, 4 y 6 h de incubación a 37°C, las muestras se analizaron por SDS-PAGE.

Las condiciones de solubilización y tripsinización optimizadas en este ítem se emplearon para obtener las preparaciones que se ensayaron en bioensayos “finos” (ítem 3.2.) y en la cuantificación de proteínas (ítem 6.3.).

### 6.3. Cuantificación de proteínas.

La cuantificación de proteínas se realizó a partir de muestras de *pellet* (ver ítem 2 y 8.4.) solubilizados en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH 10,6 a 37°C durante toda la noche respetando las proporciones establecidas en el ítem 6.2.

#### 6.3.1. Método de Bradford (Bradford, 1976).

- 1) Se prepararon distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), entre 100 a 750 µg/ml y varias diluciones de las muestras a cuantificar;
- 2) se tomaron 50 µl de cada solución estándar o muestra y se le agregó 1,5 ml del reactivo de Bradford (Thermo Scientific-Pierce);
- 3) estas mezclas se homogenizaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 10 min;
- 4) se midió en un espectrofotómetro (Spectrum SP2000uv) la absorbancia a 595 nm de las concentraciones del estándar y de las muestras;
- 5) se representó gráficamente una recta patrón de absorbancia a 595 nm frente a la concentración de las distintas diluciones de BSA utilizadas;
- 6) se interpoló en la recta patrón los valores de la absorbancia a 595 nm obtenidos para las muestras cuya concentración se pretendía determinar.

#### 6.3.2. Método de cuantificación en SDS-PAGE.

- 1) Se prepararon distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), entre 250 y 1500 µg/ml y de las muestras a cuantificar;
- 2) se realizó un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (ver ítem 6.1) sembrando 5 concentraciones de BSA y las proteínas solubilizadas de la cepa seleccionada al menos por triplicado;
- 3) el gel ya coloreado se colocó entre dos hojas de papel celofán (Sigma-Aldrich) y se dejó secar a 29°C durante 24 h;

4) mediante el programa Image J (versión 1.46r), se cuantificó la concentración de proteínas en cada banda. El programa determina la intensidad de las bandas generando gráficos de área. Cada una de las áreas obtenidas de la cepa seleccionada se compara con las áreas de las concentraciones de BSA y se estima la concentración de proteínas.

## **7. Materiales y metodologías para el análisis de ácidos nucleicos.**

### **7.1. Extracción de ADN total.**

#### **7.1.1. Método de hervor simple.**

Las cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* fueron cultivadas en agar nutritivo (Difco) durante 16 h. Se transfirió un asa cubierta de células a un tubo eppendorf conteniendo 100 µl de agua desionizada estéril y se colocó en un placa calefactora a 95°C durante 10 min para romper las células y liberar el ADN. Este lisado se centrifugó durante 30 s a 18.800 xg (Sigma 1-15pk). Cinco µl del sobrenadante se utilizaron como ADN molde por tubo de reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (ver ítem 7.3).

#### **7.1.2. Método descrito por Reyes-Ramírez e Ibarra (2005).**

Esta metodología se utilizó para la obtención del ADN que se empleó como molde para reacciones de REP-PCR (ver sección 7.3). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1) de una placa de agar nutritivo (Difco) incubada a 29°C durante 72 h se tomó una colonia y se la sembró en 4,5 ml de caldo LB (Becton, Dickinson) (DO a 600nm, 1);
- 2) se tomaron 4 ml del cultivo fresco y se centrifugó a 10.000 xg (Thermo scientific Sorvall RC 6+) y 4°C durante 15 min;
- 3) el *pellet* se lavó con 10 ml de buffer J (Tris-HCl 1 M; EDTA 0,1 M; NaCl 0,15 M; pH 8);
- 4) el *pellet* se resuspendió en 530 µl de buffer J y se agregó lisozima (Sigma) hasta alcanzar una concentración de 4 mg/ml y se incubó a 37°C durante 30 min;
- 5) se agregaron 50 µl de RNAsa (Sigma) (10 mg/ml) y se incubó a 50°C durante 15 min;
- 6) luego se agregaron 28 µl de SDS 20% y se incubó a 70°C durante 20 min;
- 7) se agregaron 18 µl de proteinasa K (Promega) (10 mg/ml) y se incubó a 55°C toda la noche;

- 8) a continuación se agregaron 153  $\mu$ l de NaCl 5 M y se incubó en baño de hielo por 15 min en agitación;
- 9) se centrifugó a 10.700 xg (Sigma 1-15pk) a 4°C durante 20 min;
- 10) el sobrenadante se mezcló con igual volumen de isopropanol para precipitar el ADN y se centrifugó nuevamente a 18.800 xg (Sigma 1-15pk) a 4°C durante 20 min;
- 11) se lavó el *pellet* con etanol 70% y se centrifugó a 18.800 xg durante 5 min (Sigma 1-15pk). Se dejó secar el ADN al aire libre durante 1 h;
- 12) finalmente se resuspendió en 40  $\mu$ l del buffer Tris-EDTA (pH 8) almacenándolo a -20°C hasta su uso.

### 7.2. Obtención de ADN plasmídico.

Los plásmidos de las cepas seleccionadas por su toxicidad para *A. grandis*, se obtuvieron mediante el método descrito previamente por Ibarra *et al.* (2003) con modificaciones:

- 1) una colonia de un cultivo de 24 h en agar nutritivo (Difco) se repicó en 100 ml de caldo Spizizen ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 14 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,2 g; citrato de sodio, 1 g; extracto de levadura, 0,1 g; casaminoácidos, 1 g; glucosa, 5 g; agua destilada c.s.p 1 litro. Ajustar pH a 7,1-7,2 con NaOH), y se incubó a 250 rpm y 30°C durante 12 h hasta obtener un DO (600 nm) de 1,0;
- 2) se centrifugó por 10 min a 4.300 xg (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), se eliminaron los restos celulares y el *pellet* se resuspendió en 25 ml de buffer TES (Tris base 30 mM; EDTA 5 mM; NaCl 50 mM; pH 8) frío;
- 3) se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones que en el ítem anterior y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se resuspendió esta vez en 2 ml de TES-sacarosa-lisozima (sacarosa 20% en TES; 1mg/ml de lisozima (Sigma)) y 1  $\mu$ l/ml de RNAasa A (Sigma) preparado en el momento. Luego se incubó a 37°C durante 2 h hasta observar esferoplastos al microscopio óptico de contraste de fases (Nikon eclipse E 200);
- 4) esta suspensión se incubó durante 10 min en hielo, para luego agregarle 4 ml de una solución conteniendo SDS 1% y NaOH 0,2 N, que se preparó en el momento. Se mezcló suavemente hasta obtener una solución clara o sin grumos. Se incubó posteriormente en hielo durante 5 min;
- 5) se agregó 3 ml de una solución de acetato de sodio 3M, pH 4,8 y se incubó a -20°C durante 20 min;

- 6) se centrifugó a 17.000 xg (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) durante 15 min y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo con 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el ADNp (ADN plasmídico). Se incubó en estas condiciones a -70°C durante 30 min;
- 7) se centrifugó a 20.000 xg (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) y 4°C durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 250 µl de etanol absoluto. Se centrifugó nuevamente a 20.000 xg (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 30 min, donde queda el ADNp;
- 8) se resuspendió el *pellet* en 250 µl de agua desionizada estéril y se trasvasó a un tubo de 1,5 ml. Luego se agregó 150 µl de acetato de amonio 7,5 M, 10 µl de bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y se extrajo con un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) homogenizando lentamente. Se centrifugó a 11.100 xg (Sigma 1-15pk) durante 5 min y se descartó la fase orgánica;
- 9) se realizó otra extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, homogenizando suavemente. Se centrifugó a 11.100 xg (Sigma 1-15pk) y 20°C durante 5 min y se descartó la fase orgánica nuevamente;
- 10) se precipitó con 2 volúmenes de etanol frío incubando a -70°C por 30 min;
- 11) el ADNp se lavó con 2 volúmenes de etanol 70% frío y se centrifugó a 11.100 xg (Sigma 1-15pk) y 20°C durante 5 min. Se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 30 min;
- 12) este se resuspendió en 50 µl de agua desionizada estéril;
- 13) una alícuota se analizó en un gel de agarosa de 0,6% a 30 V en TBE 0,5x durante toda la noche.

### **7.3. Amplificación génica mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).**

Esta metodología se utilizó para la detección e identificación de genes *cry* y *vip* que codifican proteínas tóxicas para coleópteros presentes en cepas nativas de *B. thuringiensis* seleccionadas por su toxicidad para *A. diaperinus*. Además, se utilizó en cepas nativas tóxicas para *A. grandis* una REP-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-PCR*) para su tipificación y establecimiento de relaciones de parentesco. Asimismo se determinó la presencia del gen *thuE*, asociado a la síntesis de  $\beta$ -exotoxina de tipo I, en todas las cepas utilizadas en este trabajo.

### 7.3.1. Mezcla de reacción.

En la tabla 6 se muestra el protocolo utilizado para todas las reacciones, con adaptaciones según el caso.

**Tabla 6.** Mezclas de reacción para PCR.

Reactivos	Volumen ( $\mu$ l)	Concentración final
Agua desionizada c.s.p	25	
Buffer 10x	2,5	1x
Mezcla de dNTP (2,5 mM c/u)	0,5-1,0	0,05-0,10 mM c/u
Cebador D <sup>1</sup> (10 $\mu$ M)	0,8-5,5	0,32-2,20 $\mu$ M
Cebador R <sup>2</sup> (10 $\mu$ M)	0,8-6,9	0,32-2,20 $\mu$ M
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,0-4,0	1-4 mM
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5U/ $\mu$ l) <sup>3</sup>	0,2-1,0	1,0-5,0 U

<sup>1</sup>D, directo; <sup>2</sup> R, reverso; <sup>3</sup> enzima *Taq DNA polymerase, Recombinant* (Invitrogen).

### 7.3.2. Parámetros de la reacción.

Los ciclos de todas las reacciones se realizaron en un termociclador IVEMA T-18 (Tabla 7).

**Tabla 7.** Parámetros generales de reacción de PCR.

Temperatura ( $^{\circ}$ C)	Etapa	Tiempo (min)
94	<b>desnaturalización inicial</b>	1 a 5
	25 a 34 ciclos	
94*	<b>desnaturalización</b>	1
	<b><i>annealing</i></b>	0,75 a 1
72	<b>elongación</b>	0,75 a 1,5
72	<b>elongación final</b>	5 a 10

\*Las temperaturas de *annealing* de los distintos cebadores se encuentran en la tabla 8.

**7.3.3. Cebadores.**

Los cebadores utilizados para las reacciones de amplificación de PCR de fragmentos de genes que codifican proteínas coleopteridas, del gen *thuE* y de la REP-PCR se encuentran descritos en la tabla 8.

**Tabla 8.** Mezclas de cebadores utilizados en este trabajo.

Nombre	Gen blanco	Cebador (secuencia 5'-3') <sup>1</sup>	T <sub>a</sub> <sup>2</sup>	Fragmento esperado	Referencia
S3F	<i>cry3</i>	TGA ATC CRA ACA ATC GAA GTG	49	ca. 820 pb	Sauka <i>et al.</i> , no publicado
S3R		GTT AAW GTC ATY TCT CTG CGA			
S7F	<i>cry7</i>	TAG GTG TCC CAG GTG CAA G	54	358 pb	Sauka <i>et al.</i> , no publicado
S7R		GCC GCT TGT GCG TAA ACT G			
S8F	<i>cry8</i>	GAA TGC CTA TCS GAT GA	46	ca. 930 pb	Sauka <i>et al.</i> , no publicado
S8R		CCA BGC TTG TTG GAG TC			
S23F	<i>cry23</i>	AAA GCA CAT ACG ATC CCT CA	49	702 pb	Sauka <i>et al.</i> , no publicado
S23R		CAT TTG GTG CTA ATG AAC CAT			
S37F	<i>cry37</i>	CGC AAC TTT CAC CAT TAA TTT C	49	330 pb	Sauka <i>et al.</i> , no publicado
S37R		GAA CCT TTC TCA TCG CCA TC			
Vip1F	<i>vip1</i>	TGG ATT GGW TTG ATT CAR AG	49	ca. 530 pb	Onco, 2012
Vip1R		TAR GGA TCT CCA ACT GTR TG			
Vip2R	<i>vip2</i>	TGG AAA YTA ACY GYT ACT G	49	826 pb	Onco, 2012
Vip2F		GAT AAC CAA ATT CYG SCA T			
BEF1	<i>thuE</i>	GCG GCA GCC GTT TAT TCA AA	54	384 pb	Sauka <i>et al.</i> , 2014
BER1		CCC CTT CCC ATG GAG AAA CA			

---

BEF2	<i>thuE</i>	CAG TAA AAG GCC CAT TGG AA	54	406 pb	Sauka <i>et al.</i> ,
BER2		TTC CAT GAA TTT GCC GAT TT			2014
REP-1		ATT AAA GTT TCA CTT TAT	42	*	Reyes-
REP-2		TTA AAT CAG TGG GG			Ramírez e Ibarra, 2005

---

<sup>1</sup> Código universal para bases degeneradas: W, A/T; R, A/G; Y, C/T; S, G/C. <sup>2</sup> *Ta*, temperatura de *annealing*. \* El blanco de estos cebadores son fragmentos repetitivos que se encuentran a lo largo del genoma de *B. thuringiensis*.

#### **7.4. Electroforesis en geles de agarosa.**

- 1) Para identificar y separar fragmentos de ADN, se realizaron geles de agarosa (Invitrogen) de concentración apropiada dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar (0,6 a 1,5% disuelta en buffer TAE 1x [Tris-acetato 0,04M y EDTA 0,001M] o TBE 0,5x [Tris-borato 0,04 M y EDTA 0,001 M] según corresponda);
- 2) se le agregó *Gel Red Nucleic Acid Gel Stain 10.000x in Water* (Biotum) en proporción 1:10.000 para la tinción;
- 3) se cargó el gel con 10 µl de las muestras y 2 µl de buffer de carga 6x (azul bromofenol 0,25% y glicerol al 40% en agua desionizada);
- 4) se realizó la separación mediante electroforesis (5 a 20 V/cm) utilizando buffer TAE 1x o TBE 0,5x;
- 5) las bandas de ADN se visualizaron en *UV Transilluminator 2000* (BIO-RAD);
- 6) se estimó el tamaño de los fragmento de ADN por comparación con marcadores de peso molecular (*100bp DNA Ladder*, Promega; *1Kb DNA Ladder*, Invitrogen);
- 7) los geles fueron fotografiados utilizando un adquisidor de imágenes *G:BOX* (SynGene), empleando el programa *GenSnap* (SynGene) para su visualización y edición.

#### **7.5. Análisis filogenético de los resultados obtenidos mediante REP-PCR.**

Se identificaron individualmente las bandas polimórficas a partir de los perfiles electroforéticos obtenidos por REP-PCR (ver ítem 7.3) de cada cepa comprendidas entre 0,3 y 3,0 kb de peso. Luego se construyó manualmente una matriz binaria de datos (0, ausencia

de banda; 1, presencia de banda) con la finalidad de comparar los polimorfismos obtenidos en el grupo de muestras analizadas. Se generaron posteriormente coeficientes de similitud de Jaccard empleando la aplicación SIMQUAL del paquete informático NTSYSpc 2.02g (Applied Biostatistics, Inc.). Finalmente se generó un análisis de *clusters* con sus correspondientes dendogramas por el método UPGMA (media aritmética no ponderada) usando las rutinas SAHN y TREE del paquete informático mencionado.

### **8. Materiales y metodologías para la selección y mejoramiento de medios de cultivo.**

Los materiales y metodologías que se detallan a continuación se utilizaron para la selección de un medio de cultivo apropiado para la producción de la cepa seleccionada por su toxicidad para *A. diaperinus*, y para su mejoramiento, tomando como parámetro de medida la concentración de proteínas insecticidas producidas.

#### **8.1. Preparación del inóculo.**

A partir de un cultivo de la cepa en estudio en agar nutritivo (Difco) incubado a 29°C durante 16-18 h, se tomó una colonia y se la inoculó en 1 ml de caldo Luria Bertani (LB) (Becton Dickinson) incubándose bajo la misma condición de temperatura durante 8 h. Se tomó todo el mililitro para inocular en 50 ml de caldo LB (Becton Dickinson) contenidos en erlenmeyers de 500 ml, incubándose a 250 rpm a 29°C durante 16-18 h hasta obtener un cultivo con una densidad óptica (DO) medida a 600 nm de 2,5.

#### **8.2. Medios de cultivo empleados.**

Se evaluaron distintos medios de esporulación de *B. thuringiensis* reportados en la bibliografía: Caldo T (Ben Khedher *et al.*, 2011), Caldo K (Kurt *et al.*, 2005) y Caldo A (Avignone-Rossa *et al.*, 1992) (Tabla 9). A su vez se evaluó también el crecimiento en caldo BM (ver ítem 2) y en caldo BM con el agregado de almidón soluble (2,5 g/l).

Se sembraron erlenmeyers de 500 ml conteniendo 50 ml de los medios a evaluar con 500 µl del inóculo (ver ítem 8.1.), e incubados a 250 rpm a 29°C durante 96 h.

**Tabla 9.** Composición de los medios de cultivo empleados para la cepa seleccionada por su toxicidad para *A. diaperinus*.

Componentes	Caldo T (g/l)	Caldo K (g/l)	Caldo A (g/l)
Glucosa	22,5	0,5	7
Glicerol	4,8	-	-
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5,4	-	3
Extracto de Levadura	5,8	-	0,47
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	3,4	1,5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1	4,35	1,5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,3	-	0,5
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,008	0,6	0,05
FeSO <sub>4</sub>	0,01	-	-
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,2	-	0,08
Caldo Nutritivo	-	0,4	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	-	0,82	-
MnCl <sub>2</sub>	-	0,012	-

### 8.3. Diseños experimentales para el mejoramiento del medio de cultivo.

Para el proceso de mejoramiento del caldo BM propiamente dicho se empleó la metodología descrita por Ben Khedher *et al.* (2011). Primero se determinó cuales eran los componentes del medio que afectaban significativamente la producción de proteínas insecticidas mediante el diseño estadístico de Plackett-Burman. Se diseñaron 12 experimentos (12 medios de cultivo), donde cada componente (variable) de la fórmula del medio basal se incorporó en dos niveles (-1; +1) (Tabla 10).

**Tabla 10.** Matriz con los 12 experimentos diseñados por Plackett-Burman.

Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	X <sub>4</sub>	X <sub>5</sub>	X <sub>6</sub>	X <sub>7</sub>	X <sub>8</sub>
1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1
2	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1
3	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1

<b>4</b>	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
<b>5</b>	-1	-1	+1	+1	+1	-1	+1	+1
<b>6</b>	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
<b>7</b>	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
<b>8</b>	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
<b>9</b>	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
<b>10</b>	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1
<b>11</b>	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
<b>12</b>	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1

El modelo matemático asociado con el diseño de tamizaje de Plackett-Burman es un modelo aditivo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \dots + \beta_{11} X_{11}$$

Donde Y es la respuesta teórica,  $\beta_i$  (i= 1-11) representa los coeficientes teóricos y  $X_i$  (i= 1-11) son variables codificadas.

Los niveles atribuidos a cada variable se establecieron arbitrariamente en un 50% por debajo y por encima de su composición en relación al medio basal (Tabla 11).

**Tabla 11.** Valores de los niveles de los distintos componentes del medio.

Variables	Componentes (g/l)	Niveles de las variables	
		+1	-1
<b>X<sub>1</sub></b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,5	1,5
<b>X<sub>2</sub></b>	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,25	3,75
<b>X<sub>3</sub></b>	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,125	0,375
<b>X<sub>4</sub></b>	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	0,05	0,15
<b>X<sub>5</sub></b>	Glucosa	2,5	7,5
<b>X<sub>6</sub></b>	Almidón	1,25	3,75
<b>X<sub>7</sub></b>	Extracto de levadura	2	6
<b>X<sub>8</sub></b>	NaCl	1,25	3,75

Los coeficientes  $\beta_i$  se calcularon mediante regresión de cuadrados mínimos a partir de los resultados experimentales. Estos coeficientes representan la variación de la respuesta observada entre los niveles de dos factores. Las variables estadísticamente significativas se identificaron mediante una prueba t-Student.

En una segunda etapa, una vez establecidos los componentes del medio con efecto significativo sobre la producción de proteínas, se utilizó la metodología de superficie de respuesta para determinar los valores óptimos de los factores seleccionados. Se desarrolló un diseño central compuesto de tipo rotatorio (DCC) con dos factores ( $\alpha = \pm 1,41$ ). Cada variable fue analizada a cinco niveles ( $-\alpha$ ; -1; 0; +1;  $+\alpha$ ) como se observa en la tabla 12. Los valores de los otros componentes del medio quedaron en su valor basal.

**Tabla 12.** Valores de los niveles de las dos variables seleccionadas.

Variable	Componentes	Niveles de las variables				
		-1,41	-1	0	+1	+1,41
X <sub>1</sub>	Extracto de levadura	1,18	2	4	6	6,82
X <sub>2</sub>	Almidón	0,74	1,25	2,5	3,75	4,26

Se diseñaron 12 experimentos los cuales incluían 2<sup>2</sup> puntos factoriales, 4 puntos centrales y 4 puntos axiales (tabla 13).

**Tabla 13.** Matriz con los experimentos diseñados por DCC.

Corrida	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
1	-1,0	-1,0
2	-1,0	1,0
3	+1,41	0,0
4	-1,41	0,0
5	0,0	-1,41
6	1,0	1,0
7	1,0	-1,0

<b>8</b>	0,0	+1,41
<b>9</b>	0,0	0,0
<b>10</b>	0,0	0,0
<b>11</b>	0,0	0,0
<b>12</b>	0,0	0,0

El modelo de segundo orden asociado a un diseño DCC de dos variables fue el siguiente:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1^2 + \beta_4 X_2^2 + \beta_5 X_1 X_2$$

Donde Y es la respuesta teórica,  $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_5$  representan los coeficientes teóricos y  $X_j$  (j= 1-2) son las variables codificadas seleccionadas para el DCC.

Los coeficientes del modelo fueron estimados a través de regresión lineal múltiple. Las cuatro replicas del punto central permitieron estimar la variabilidad de los resultados experimentales.

La compatibilidad del modelo propuesto con la información de los resultados experimentales obtenidos se verificó a través de un análisis de varianza. El modelo validado se utilizó para determinar el gráfico de superficie respuesta el cual brindó una representación gráfica de los datos en función del rango de niveles de los parámetros estudiados.

El software STATGRAPHICS Centurion XVI se utilizó para generar el diseño de Plackett-Burman y el DCC, y para el análisis de los resultados experimentales.

#### **8.4. Parámetros de medición.**

Se determinó para todos los experimentos la concentración de proteínas solubilizadas a partir de *pellets* de cada cultivo. Se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó a 16.000 xg (Sigma 1-15 pk). Se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con 1 ml de agua desionizada estéril y se centrifugó nuevamente a 16.000 xg (Sigma 1-15 pk). Este procedimiento se repitió dos veces más. El *pellet* se resuspendió en Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM, pH 10,6 para solubilizar los cristales de proteínas insecticidas respetando las proporciones y condiciones de incubación

establecidas en el ítem 6.2. Finalmente se cuantificaron las proteínas totales en el sobrenadante de acuerdo al método de Bradford (ver ítem 6.3.1.).

Se midió al final de los experimentos la DO de los cultivos a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Spectrum SP2000UV). Se utilizó como blanco el mismo medio de cultivo estéril. Se determinó el pH de los cultivos empleando un pH-metro (Thermo Scientific ORION 4 STAR). Finalmente, se tomó una muestra de 2 ml de cada cultivo y se pasteurizaron a 80°C durante 10 min en un baño de agua. A continuación se mantuvo durante 5 min en hielo y se estimó el número de esporas a través de recuentos de unidades formadoras de colonias (UFC). Se utilizaron placas con agar nutritivo (Difco) que se incubaron a 29°C durante 24 h.



*Resultados*

*y*

*discusión*



## **Resultados y discusión**

Los resultados del presente estudio y su discusión se presentan en dos secciones principales:

- 1) “Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis*”.
- 2) “Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Alphitobius diaperinus*. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa”.

### **SECCIÓN 1: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis*.**

Se realizó un estudio de tamizaje empleando cultivos líquidos completos de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* en búsqueda de aquellas patógenas para larvas de *A. grandis*. Una vez seleccionadas las cepas tóxicas, se determinó la fracción del cultivo donde se encontraban él o los metabolitos responsables de la toxicidad (*pellet* conteniendo esporas y cristales o sobrenadante). A través de esta estrategia se pudo determinar si la mortalidad fue causada por las proteínas insecticidas de los cristales, o por otros factores de virulencia liberados al medio de cultivo por la bacteria. Finalmente se caracterizaron fenotípica y genotípicamente las cepas seleccionadas.

#### **1.1. Tamizaje de cepas tóxicas para el picudo del algodón.**

Se realizó la evaluación toxicológica de los cultivos completos de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* mediante bioensayos “burdos” utilizando larvas neonatas de *A. grandis*. Las 124 cepas evaluadas (100 cepas nativas y 24 exóticas), demostraron cierto nivel de toxicidad frente a dicha plaga (Tabla 14 y 15). Se registraron mortalidades comprendidas

entre 2% a 87% y 3% a 78% en las cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* respectivamente. No obstante, la mayoría de ellas presentaron una baja virulencia con porcentajes de mortalidad menores al 30% (Tabla 14 y 15).

**Tabla 14.** Actividad tóxica de cultivos completos de cepas nativas de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A. grandis*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>		Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>	
		BE <sup>3</sup>	thuE <sup>4</sup>			BE <sup>3</sup>	thuE <sup>4</sup>
INTA H1-1	28,3 ± 3,1	-	-	INTA Mo15-2	30,4 ± 0,0	-	-
INTA H1-2	45,5 ± 12,9	-	-	INTA H17-5	28,6 ± 6,7	-	-
INTA L1-2	34,1 ± 3,2	-	-	INTA TA20-6	27,1 ± 14,7	-	-
INTA L14-2	19,6 ± 9,2	-	-	INTA Mo21-1	28,9 ± 0,4	-	-
INTA TA1-2	31,3 ± 0,0	-	-	INTA TA21-2	54,2 ± 0,0	-	-
INTA Mo1-10	22,7 ± 12,9	-	-	INTA H22-2	23,8 ± 6,7	-	-
INTA TA1-11	27,1 ± 2,9	-	-	INTA Mo22-4	29,2 ± 3,4	-	-
INTA Mo1-12	41,7 ± 5,9	-	-	INTA H22-7	35,9 ± 10,8	-	-
INTA TA1-13	20,5 ± 9,6	-	-	INTA Mo23-2	35,5 ± 5,1	-	-
INTA Ep-2	28,5 ± 15,1	-	-	INTA TA24-2	42,9 ± 6,7	-	-
INTA H2-1	28,3 ± 6,7	-	-	INTA TA24-6	29,2 ± 5,9	-	-
INTA L2-1	20,8 ± 5,9	-	-	INTA TA24-10	32,8 ± 7,8	-	-
INTA H2-5	32,6 ± 3,1	-	-	INTA H25-2	22,9 ± 2,9	-	-
INTA H2-12	15,2 ± 3,1	-	-	INTA Mo26-1	22,2 ± 13,5	-	-
INTA Ep-3	18,0 ± 0,0	-	-	INTA Mo27-1	20,8 ± 5,9	-	-
INTA VO-3	30,4 ± 6,1	-	-	INTA H27-3	10,6 ± 3,4	-	-
INTA 3-1	15,5 ± 7,0	-	-	INTA Mo28-4	49,7 ± 19,7	-	-
INTA Fo3-2	38,6 ± 3,2	-	-	INTA Mo29-1	13,4 ± 6,4	-	-
INTA H3-2	39,5 ± 8,8	+	+	INTA Mo32-3	18,2 ± 6,4	-	-
INTA H3-3	76,8 ± 4,5	-	-	INTA 33-5	25,0 ± 3,2	-	-
INTA H3-5	20,0 ± 6,3	-	-	INTA H41-1	17,4 ± 6,2	-	-
INTA H4-1	47,9 ± 2,9	+	+	INTA H42-1	31,2 ± 2,9	-	-
INTA H4-3	77,5 ± 4,5	-	-	INTA H45-4	11,1 ± 0,0	-	-

## Resultados y discusión – Sección 1

INTA Mo4-4	15,2 ± 9,2	-	-	INTA H46-3	29,1 ± 0,0	-	-
INTA Mo4-6	16,7 ± 5,9	-	-	INTA H46-12	17,7 ± 9,5	-	-
INTA Ep-5	20,8 ± 11,8	-	-	INTA H46-18	19,1 ± 13,5	-	-
INTA H5-2	41,0 ± 4,9	-	-	INTA H47-2	33,3 ± 5,9	-	-
INTA H5-5	31,8 ± 6,4	-	-	INTA H 47-3	25,0 ± 5,9	-	-
INTA Mo5-8	34,8 ± 0,0	-	-	INTA H48-5	74,3 ± 11,8	+	+
INTA Ep-6	9,3 ± 3,3	-	-	INTA H48-8	37,2 ± 3,3	-	-
INTA H6-2	19,6 ± 9,2	-	-	INTA H48-12	2,8 ± 3,9	-	-
INTA H6-3	31,0 ± 11,5	-	-	INTA H48-34	29,5 ± 9,6	-	-
INTA H7-2	29,7 ± 8,1	-	-	INTA Pol49-1	22,7 ± 6,4	-	-
INTA 7-3	45,5 ± 6,4	-	-	INTA Pol49-6	28,3 ± 9,2	-	-
INTA H7-3	34,1 ± 3,2	-	-	INTA Pol49-14	18,2 ± 6,4	-	-
INTA Fr7-4	32,5 ± 10,6	-	-	INTA 50-4	28,3 ± 15,4	-	-
INTA Fr8-1	28,6 ± 6,7	-	-	INTA 50-6	9,5 ± 6,7	-	-
INTA Mo8-1	35,4 ± 2,9	-	-	INTA 51-3	13,6 ± 6,4	-	-
INTA Mo8-2	23,9 ± 9,2	-	-	INTA 54-8	18,2 ± 6,4	-	-
INTA Mo9-1	9,5 ± 6,7	-	-	INTA 56-4	47,8 ± 6,1	-	-
INTA Mo9-5	23,8 ± 13,5	-	-	INTA 78-2	27,3 ± 0,0	-	-
INTA H11-2	20,5 ± 9,6	-	-	INTA 79-37	21,7 ± 12,3	-	-
INTA H11-4	29,5 ± 3,2	-	-	INTA 79-38	34,8 ± 6,1	-	-
INTA H12-5	40,5 ± 10,1	-	-	INTA 103-23	10,9 ± 3,1	-	-
INTA H13-5	33,3 ± 13,5	-	-	INTA 180-12	10,6 ± 3,4	-	-
INTA H14-1	39,1 ± 18,4	+	+	INTA 186-1	20,5 ± 3,2	-	-
INTA Mo14-1	73,5 ± 6,5	-	-	INTA 186-5	6,8 ± 3,2	-	-
INTA Mo14-2	30,4 ± 0,0	-	-	INTA 186-16	30,4 ± 0,0	-	-
INTA Mo14-3	47,8 ± 13,2	-	-	INTA 186-35	22,7 ± 0,0	-	-
INTA Mo14-4	22,7 ± 6,4	-	-	INTA 194-9	34,8 ± 10,7	-	-

<sup>1</sup> Media ± DE. <sup>2</sup> Detección de  $\beta$ -exotoxina. <sup>3</sup> Presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -exotoxina detectada a través de bioensayos con *Musca domestica*. <sup>4</sup> *thuE*: detección del gen involucrado en la síntesis de  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante PCR.

**Tabla 15.** Actividad tóxica de cultivos completos de cepas exóticas de *B. thuringiensis* contra larvas neonatas de *A. grandis*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>		Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>	
		BE <sup>3</sup>	thuE <sup>4</sup>			BE <sup>3</sup>	thuE <sup>4</sup>
<i>aizawai</i> HD-137	19,6 ± 3,1	-	-	<i>morrisoni</i> 4AB1	8,7 ± 6,1	-	-
<i>alesti</i> HD-4	21,7 ± 0,0	-	-	<i>morrisoni</i> HD-12	40,2 ± 10,7	+	-
<i>asturiensis</i> 4BQ1	23,9 ± 9,2	-	-	<i>pakistani</i> 4P1	28,3 ± 3,1	-	-
<i>canadensis</i> HD-224	33,5 ± 4,3	-	-	<i>roskildiensis</i> T45001	29,5 ± 3,2	-	-
<i>entomocidus</i> HD-110	39,5 ± 7,6	-	-	<i>sotto</i> HD-6	11,4 ± 3,2	-	-
<i>galleriae</i> T05001	34,8 ± 6,1	-	-	<i>thompsoni</i> HD-542	71,7 ± 6,8	+	+
<i>israelensis</i> IPS-82	2,3 ± 0,0	-	-	<i>thuringiensis</i> HD-2	86,7 ± 6,3	+	+
<i>japonensis</i> 4AT1	25,0 ± 3,2	-	-	<i>tochigiensis</i> 4Y1	19,6 ± 3,1	-	-
<i>kenyae</i> HD-5	7,1 ± 3,1	-	-	<i>tolworthi</i> HD-125	66,6 ± 6,2	+	+
<i>kumamotoensis</i> 4W1	19,6 ± 6,1	-	-	<i>toumanoffi</i> HD-201	47,7 ± 3,2	-	-
<i>kurstaki</i> HD-1	22,7 ± 6,4	-	-	<i>wuhanensis</i> HD-525	32,5 ± 10,6	-	-
<i>kyushuensis</i> HD-541	8,7 ± 6,1	-	-				
<i>morrisoni tenebrionis</i>							
DSM2803	18,8 ± 1,9	-	-				

<sup>1</sup> Media ± DE. <sup>2</sup> Detección de  $\beta$ -exotoxina. <sup>3</sup> BE: Presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -exotoxina detectada a través de bioensayos con *Musca domestica*. <sup>4</sup> thuE: detección del gen involucrado en la síntesis de  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante PCR.

Solo el 5,0% (5/100) de las cepas nativas y 12,5% (3/24) de las cepas exóticas causaron una mortalidad mayor al 50%. Martins *et al.* (2007) obtuvieron datos similares. Ellos observaron que el 2,3% (5/215) de las cepas brasileñas de *B. thuringiensis* estudiadas, produjeron mortalidades superiores al 50%, al ensayar volúmenes de cultivo completo mayores que en el presente trabajo. Estos resultados podrían estar revelando un poder patogénico mayor de nuestras cepas nativas contra el picudo del algodón. Por otra parte, esta diferencia podría deberse a una susceptibilidad mayor de las poblaciones argentinas de *A. grandis* a *B. thuringiensis*. Se ha encontrado que diferentes poblaciones de una plaga

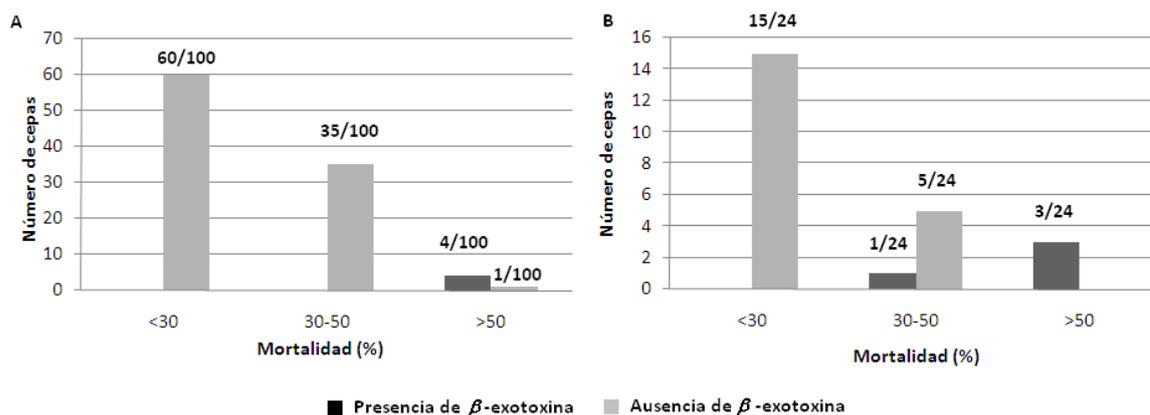
pueden presentar distinta susceptibilidad frente a cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* o a distintas preparaciones de proteínas Cry puras (Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2001; Monnerat *et al.*, 2006). Algunas diferencias comenzaron a aparecer cuando comparamos nuestros resultados con los datos de toxicidad de dos cepas exóticas reportadas previamente por Monnerat *et al.* (2006). Contrariamente a lo observado en nuestros resultados (Tabla 15), estos autores observaron que *B. thuringiensis* serovar *israelensis* mostró ser significativamente más tóxica para *A. grandis* que *B. thuringiensis* serovar *morrisoni* cepa *tenebrionis*. Además, comunicaron que suspensiones espora-cristal de *B. thuringiensis* serovar *morrisoni* cepa *san diego* (4AB1) resultaron más tóxicas que los de cepas pertenecientes al serovar *kurstaki* y al serovar *morrisoni* cepa *tenebrionis* (Gomez *et al.*, 2006).

Finalmente, las cepas nativas más tóxicas *B. thuringiensis* INTA H4-3, INTA H3-3, INTA Mo14-1 e INTA H48-5, y las cepas exóticas *B. thuringiensis* serovar *thuringiensis* HD-2, *thompsoni* HD-542 y *tolworthi* HD-125, fueron seleccionadas para estudios posteriores.

### **1.2. Correspondencia de niveles altos de toxicidad para *A. grandis* y la producción de $\beta$ -exotoxina.**

La presencia o ausencia de  $\beta$ -exotoxina fue evidenciada a través de bioensayos realizados empleando el “método para ensayos múltiples” con *Musca domestica*. Estos resultados se asociaron con aquellos obtenidos de la amplificación génica de *thuE*, gen involucrado particularmente en la producción de  $\beta$ -exotoxina de tipo I (Liu *et al.*, 2010). La determinación de la presencia de  $\beta$ -exotoxina en una cepa determinada es importante, ya que debido a su acción inespecífica, su uso está prohibido como ingrediente activo en formulados que contengan a *B. thuringiensis* (Rosell *et al.*, 2008).

El 4,0% de las cepas nativas (4/100) y el 16,7% de las exóticas (4/24) demostraron ser productoras de  $\beta$ -exotoxina (Tabla 14 y 15). En la figura 7 se observa la diferenciación de las cepas de *B. thuringiensis* de acuerdo a sus niveles de toxicidad y la presencia de  $\beta$ -exotoxina.



**Fig. 7.** Número de cepas nativas (A) y exóticas (B) de *B. thuringiensis* productoras y no productoras de  $\beta$ -exotoxina en relación a su mortalidad para *A. grandis*.

Ninguna de las cepas con porcentajes de mortalidad menores al 30% demostró ser productora de  $\beta$ -exotoxina. Por el contrario, las cepas que presentaron porcentajes de mortalidad superiores al 50% en el picudo del algodón resultaron ser productoras del mencionado metabolito (en este caso una  $\beta$ -exotoxina de tipo I). Esto último quedó evidenciado al observar en estos bioensayos que ninguno de los adultos de *M. domestica* emergió debido a una notoria malformación de las pupas, y a su vez se observó la presencia de la banda electroforética perteneciente al gen *thuE*. La capacidad de producción de  $\beta$ -exotoxina se corroboró en las cuatro cepas nativas y en las tres cepas exóticas más tóxicas para el picudo, realizando ensayos confirmatorios con *Musca domestica*, pero en esta oportunidad, empleando sobrenadantes de cultivos filtrados y autoclavados donde sólo la  $\beta$ -exotoxina, debido a su termoresistencia, puede persistir. Allí también se observaron efectos teratógenicos sobre las pupas que impidieron que los adultos emerjan. En concordancia con lo expuesto por otros autores (Espinasse *et al.*, 2003), estos resultados sugieren una fuerte asociación entre la toxicidad para *A. grandis* de una cepa particular de *B. thuringiensis* y la producción de  $\beta$ -exotoxina por parte de la misma. Este metabolito también ha sido reportado como tóxico para otras especies de coleópteros (*Lasioderma serricone*, *Leptinotarsa decemlineata* y *Diabrotica undecimpunctata*) (Burjeon *et al.*, 1969; Levinson *et al.*, 1990; Tsuchiya *et al.*, 2002).

### 1.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas nativas seleccionadas.

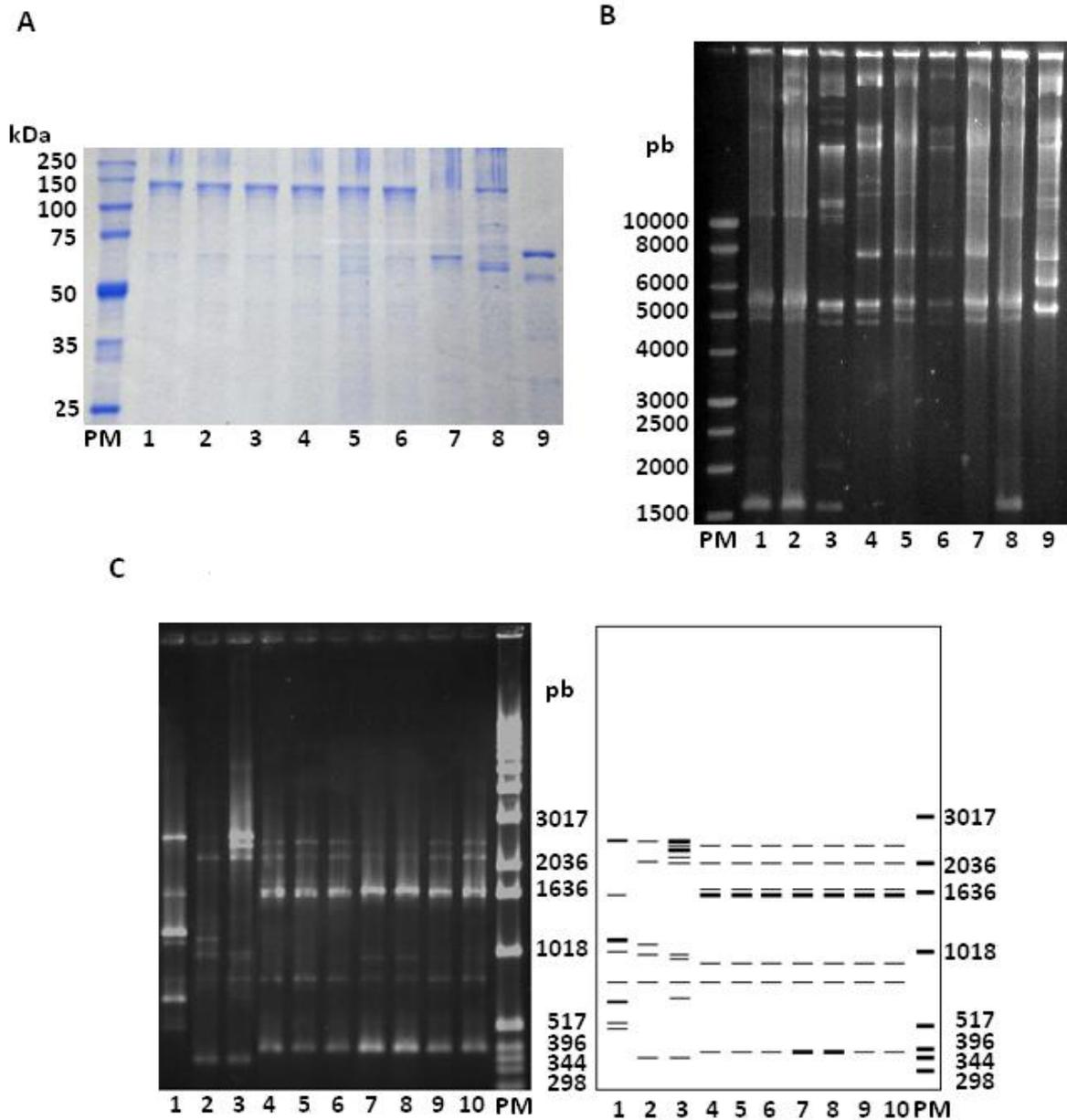
Las principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas de *B. thuringiensis* más activas contra *A. grandis* se presentaron en la tabla 16. *B. thuringiensis* INTA H4-3, INTA H3-3, INTA Mo14-1 e INTA H48-5 mostraron compartir una morfología similar de cristales de acuerdo a lo determinado mediante microscopia de contraste de fases, cristales con perfiles proteicos similares según lo revelado por SDS-PAGE (Fig. 8A), y perfiles de genes *cry* y *vip* idénticos determinados por PCR (Sauka, 2007; Sauka *et al.*, 2012). Estas cepas producen cristales bipiramidales y cúbicos, proteínas principales de ca. 130 y 65 kDa consistentes con la presencia de genes *cry1* y *cry2*.

**Tabla 16.** Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas más tóxicas.

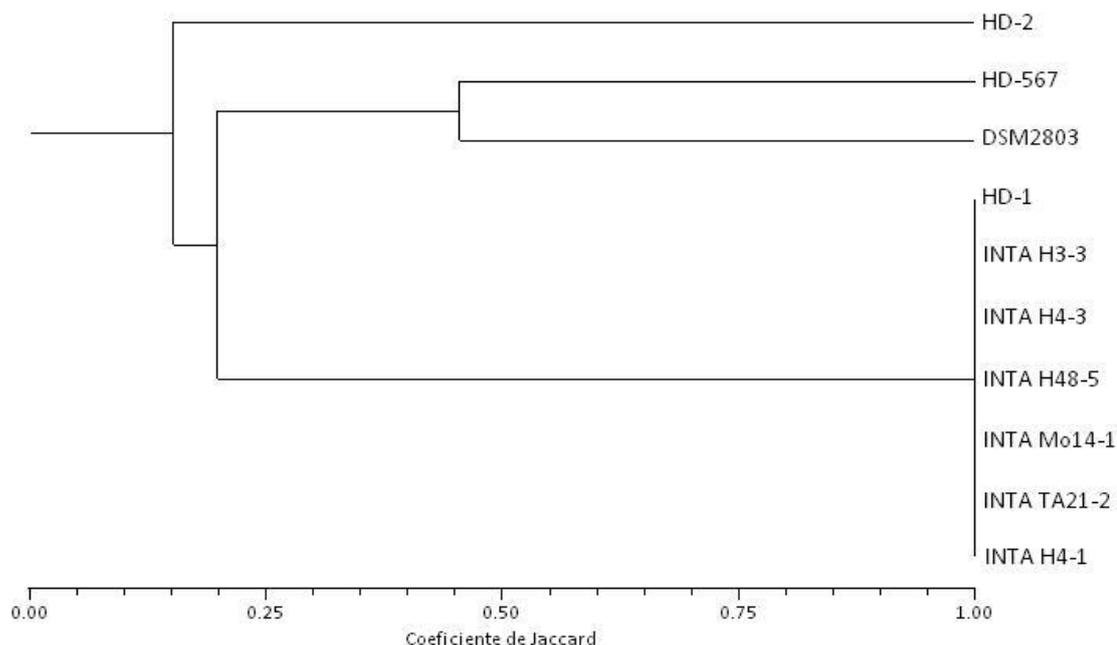
Cepa	Morfología de cristales <sup>1</sup>	Tamaño de las proteínas (kDa)	Perfil de genes <i>cry</i> y <i>vip</i>
INTAH4-3	B y Cu	ca. 130 y 65	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA H3-3	B y Cu	ca. 130 y 65	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA Mo14-1	B y Cu	ca. 130 y 65	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTAH48-5	B y Cu	ca. 130 y 65	<i>cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>

<sup>1</sup>B, bipiramidales; Cu, cúbicos.

Todas estas características de las cepas tóxicas para el picudo del algodónero se asemejan más a caracteres de cepas de *B. thuringiensis* lepidopteridas en vez de cepas coleopteridas (Sauka y Benintende, 2008). La evidencia que apoya esta afirmación radica en que estas cepas mostraron perfiles electroforéticos de REP-PCR idénticos a la cepa de referencia HD-1 (Fig. 8C), lo que indicó que estas cepas nativas podrían pertenecer al serovar *kurstaki*, de acuerdo con las conclusiones extraídas durante el desarrollo de esta técnica (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2005; Sauka *et al.*, 2011). A su vez, en forma complementaria, se realizó un dendograma que confirma estos resultados (Fig. 9).



**Fig. 8.** Caracterización de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* seleccionadas. A) Análisis electroforético de las proteínas que forman los cristales. Líneas: 1, INTA TA21-2; 2, INTA H4-1; 3, INTA H4-3; 4, INTA H3-3; 5, INTA Mo14-1; 6, INTA H48-5; 7, *kurstaki* HD-1; 8, *thuringiensis* HD-2; 9, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803. PM con los tamaños indicados a la izquierda (kDa) (Promega). B) Perfiles de plásmidos. Líneas: 1, INTA TA21-2; 2, *kurstaki* HD-1; 3, INTA H4-1; 4, INTA H4-3; 5, INTA Mo14-1; 6, INTA H48-5; 7, INTA H3-3; 8, *kurstaki* HD-1; 9, *thuringiensis* HD-2. PM con los tamaños indicados a la izquierda (pb) (Promega). C) Perfiles electroforéticos obtenidos mediante REP-PCR. Líneas: 1, *thuringiensis* HD-2; 2, *israelensis* HD-567; 3, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 4, *kurstaki* HD-1; 5, INTA H3-3; 6, INTA H4-3; 7, INTA H48-5; 8, INTA Mo14-1; 9, INTA TA21-2; 10, INTA H4-1. PM con los tamaños indicados a la derecha (pb) (Invitrogen).



**Fig. 9.** Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de REP-PCR obtenidos de cepas de referencia y nativas seleccionadas de *B. thuringiensis*.

*B. thuringiensis* serovar *kurstaki* HD-1 es la cepa más utilizada como ingrediente activo de pesticidas biológicos para el manejo de insectos lepidópteros que afectan la agricultura y la actividad forestal (Sauka y Benintende, 2008). Esta cepa presenta los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1la*, *cry2Aa*, *cry2Aby* *vip3Aa* (Zhu *et al.*, 2015), un perfil génico prácticamente idéntico al de las cuatro cepas nativas (Tabla 3). Por el contrario, algunas diferencias aparecieron cuando se determinó el perfil de plásmidos. Las cuatro cepas nativas presentaron el mismo perfil plasmídico, pero se diferenciaron del de HD-1, y del obtenido de otras cepas nativas y exóticas evaluadas (Fig. 8B). Sin embargo esta observación no pareció extraña, ya que los perfiles de plásmidos se han utilizado ampliamente en la discriminación de cepas, incluso dentro del mismo serovar (Gonzalez *et al.*, 1981; Sauka *et al.*, 2010).

#### 1.4. Identificación de factores de virulencia involucrados en la toxicidad para *A. grandis*.

Se realizaron bioensayos con distintas fracciones del cultivo de las cepas nativas y exóticas más activas para larvas neonatas de *A. grandis*, con el objeto de determinar en cuál

de ellas se encontraban los metabolitos insecticidas responsables de la toxicidad. Los resultados muestran que todas las fracciones presentaron algún nivel de actividad insecticida (Tabla 17).

Primero se comparó para cada cepa el valor del porcentaje de mortalidad del *pellet* (P) (esporas y cristales resuspendidos) con el del sobrenadante filtrado (SF), y ambos con respecto al del cultivo completo (CC), realizando un análisis de varianza (ANOVA) seguido del Test de Tukey ( $p < 0,05$ ). De este análisis surgieron varios grupos diferentes de cepas según las diferencias estadísticas observadas entre los valores de mortalidad (Tabla 17). Las cepas INTA H4-3, INTA Mo14-1, INTA H48-5, HD-2 y HD-125 se agruparon constituyendo un grupo mayoritario, ya que presentaron diferencias significativas entre P y SF, P y CC, pero no entre SF y CC. Por otro lado, la cepa INTA H3-3 mostró diferencias significativas entre P y CC, SF y CC, pero no entre P y SF. Finalmente, la cepa HD-542 mostró diferencias significativas entre las diferentes fracciones del cultivo y el CC. Estos resultados sugieren que los principales factores de toxicidad se encuentran en el SF, debido a que mostraron niveles de toxicidad similares a los de CC. Sobre todo en el grupo mayoritario de cepas, los niveles altos de actividad tóxica se pudieron correlacionar directamente con la presencia de  $\beta$ -exotoxina. Espinasse *et al.* (2003) comunicaron previamente que este metabolito sería uno de los principales responsables de la toxicidad para *A. grandis*. También se ha citado que la combinación de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki* junto con  $\beta$ -exotoxina resultó en una toxicidad potenciada para larvas neonatas de *Spodoptera exigua* (Moar *et al.*, 1986). Sin embargo, su participación en la toxicidad junto con otros factores de virulencia tales como toxinas Cry1I no se deberían descartar. En consistencia con los genes *cry1Ia* detectados por PCR, las cepas estudiadas podrían ser también productoras de Cry1Ia (Tabla 16). Este grupo de proteínas no cristaliza en *B. thuringiensis* y son liberadas al medio durante la fase inicial de la esporulación (Kostichka *et al.*, 1996). Cry1Ia se ha descrito como toxica para larvas de ciertas especies de coleópteros y lepidópteros (Tsuchiya *et al.*, 2002). En particular, algunas proteínas Cry1Ia recombinantes demostraron ser altamente tóxicas para larvas de *A. grandis* (Bergamasco *et al.*, 2011; Grossi-de-Sa *et al.*, 2007; Martins *et al.*, 2008).

**Tabla 17.** Actividad tóxica de las diferentes fracciones de los cultivos de las cepas seleccionadas por su toxicidad para *A. grandis*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)				$\beta$ -exo <sup>6</sup>
	CC <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	SF <sup>4</sup>	SFA <sup>5</sup>	
INTA H4-3	77,5 ± 4,5 <sup>a</sup>	23,9 ± 5,4 <sup>b</sup>	64,0 ± 5,8 <sup>a</sup>	43,3 ± 5,9 <sup>bc</sup>	+
INTA H3-3	76,8 ± 4,5 <sup>a</sup>	30,9 ± 3,9 <sup>b</sup>	37,7 ± 5,2 <sup>bc</sup>	40,3 ± 9,5 <sup>cd</sup>	+
INTA Mo14-1	75,4 ± 5,7 <sup>a</sup>	10,6 ± 6,0 <sup>b</sup>	74,3 ± 3,1 <sup>ac</sup>	59,8 ± 7,7 <sup>c</sup>	+
INTA H48-5	74,3 ± 11,9 <sup>a</sup>	33,0 ± 8,6 <sup>b</sup>	69,9 ± 3,6 <sup>a</sup>	46,8 ± 4,7 <sup>bc</sup>	+
<i>thuringiensis</i> HD-2	86,7 ± 6,3 <sup>a</sup>	17,8 ± 3,1 <sup>b</sup>	64,9 ± 10,2 <sup>ac</sup>	51,1 ± 6,3 <sup>c</sup>	+
<i>thompsoni</i> HD-542	71,7 ± 6,8 <sup>a</sup>	25,0 ± 4,2 <sup>b</sup>	39,5 ± 5,8 <sup>c</sup>	29,9 ± 6,5 <sup>bdc</sup>	+
<i>tolworthi</i> HD-125	66,6 ± 6,2 <sup>a</sup>	13,4 ± 4,2 <sup>b</sup>	51,1 ± 17,2 <sup>ad</sup>	28,3 ± 3,1 <sup>bcd</sup>	+

<sup>1</sup> Media ± DE. <sup>2</sup> (CC) cultivo completo. <sup>3</sup> (P) *pellet*. <sup>4</sup> (SF) Sobrenadante filtrado. <sup>5</sup> (SFA) Sobrenadante filtrado y autoclavado. <sup>6</sup> Presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -exotoxina confirmada por bioensayos con sobrenadante autoclavado y *Musca domestica*. Valores de la media con disntinta letra presentan diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Para determinar si en los sobrenadantes de los cultivos estaban presentes factores de virulencia para *A. grandis* que sean termolábiles, se comparó el porcentaje de mortalidad del SF con el del sobrenadante filtrado y autoclavado (SFA), en el cual sólo estaría presente la  $\beta$ -exotoxina. Nuevamente surgieron diferentes grupos entre las cepas evaluadas teniendo en cuenta las diferencias estadísticas observadas entre los distintos porcentajes de mortalidad (Tabla 4). Un grupo que mostró diferencias significativas entre SF y SFA, se compuso por las cepas INTA H4-3 e INTA H48-5. La baja mortalidad del SFA comparada con el SF demostraría la existencia de factores de virulencia termolábiles en SF, los que podrían contribuir significativamente en la virulencia de estas cepas para *A. grandis*. Las cepas INTA H3-3, INTA Mo14-1, HD-2, HD-542 y HD-125 se clasificaron en un grupo separado, ya que no presentaron diferencias significativas entre los distintos tratamientos. Estos resultados reflejarían que los factores de virulencia termolábiles que se encontraron en el SF no jugarían un rol importante en la virulencia de estas cepas específicas y que la toxicidad podría estar principalmente ligada a la producción de  $\beta$ -exotoxina. Las diferencias obtenidas entre los niveles de toxicidad de estos dos grupos podrían estar influenciadas por la

concentración de  $\beta$ -exotoxina producida por cada cepa, por los niveles de expresión de los genes de *cry1la* o por otro factor de virulencia secretado desconocido.

En este estudio también se observó que los P evaluados resultaron al menos ligeramente tóxicos para *A. grandis*. Esto podría atribuirse al hecho de que durante el transcurso de los siete días de duración del ensayo, las esporas germinen en la dieta de los insectos y secreten  $\beta$ -exotoxina causando mortalidad. Otra razón podría deberse a cierto grado de toxicidad de algunas proteínas Cry que estarían formando sus cristales. Algunos autores han reportado diferentes niveles de toxicidad para *A. grandis* por parte de proteínas Cry1Ba6, Cry8Ka, Cry4, Cry10Aa, Cry11A y Cyt (de Souza Aguiar *et al.*, 2012; Martins *et al.*, 2010; Monnerat *et al.*, 2012; Oliveira *et al.*, 2011). De acuerdo a nuestro conocimiento, ninguno de los genes *cry* presentes en las cepas nativas han sido reportados como codificantes de cristales con actividad coleopterocida (Tabla 3). Sims (1995) demostró que Cry1Ac, una proteína que sería expresada por las cepas nativas, no fue tóxica para el picudo. Se necesitarían realizar bioensayos con proteínas individuales de Cry1Ab, Cry1Ac y Cry2A para lograr identificar que proteína o proteínas fueron las responsables por la toxicidad de P en las cepas nativas. Sin embargo, es necesario seguir trabajando para desentrañar este punto.

Por otro lado, las diferencias estadísticas observadas entre el SF y el CC de las cepas INTA H3-3 y HD-542, pero no entre el resto de las cepas, no son fáciles de explicar. Esto podría atribuirse a una actividad sinérgica fuerte entre las esporas y los cristales del CC. Existen evidencias que las esporas en mezclas o con soluciones de toxinas Cry puras, podrían actuar sinérgicamente para aumentar la toxicidad en larvas de insectos susceptibles (Johnson y McGaughey, 1996).

Para comprender y conocer más acerca de las toxinas de las cepas nativas seleccionadas, se secuenciaron los genomas de las mismas y analizaron las secuencias nucleotídicas en búsqueda de genes codificantes de factores de virulencia para insectos (datos no publicados). Tras el análisis se observó que presentaban el mismo perfil de genes *cry/vip*, previamente identificado por PCR (*cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1la*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *vip3Aa*). Como era de esperarse, en estas cepas se detectó el *cluster* completo de genes que codifican para la  $\beta$ -exotoxina o al menos la mayoría de sus genes. A su vez se encontraron otros genes asociados a factores de virulencia que podrían actuar en forma sinérgica junto con las proteínas Cry o Vip, mejorando su actividad tóxica (ej.: zwittermicina A, una enhancina, proteasas, colagenasas, quitinasas). Además de las ya mencionadas anteriormente, no se

encontró ninguna otra toxina que se haya podido asociar con una actividad insecticida específica en estas cepas nativas.

En resumen, se seleccionaron cuatro cepas nativas y tres exóticas de *B. thuringiensis* como las más tóxicas para larvas del picudo del algodón. El uso potencial de estas cepas para la elaboración de un bioinsecticida de primera generación se vería restringido a pesar del buen nivel de actividad insecticida evidenciado. Esta afirmación radica en que un importante factor de virulencia asociado sería una  $\beta$ -exotoxina. De todos modos, estas cepas pueden ser la fuente de genes (por ej. *cry1a*) para producir plantas de algodón transgénicas resistentes a esta plaga.

## **Sección 2: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Alphitobius diaperinus*. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa.**

Primeramente se estableció una cría artificial de *A. diaperinus* en el laboratorio, para obtener las larvas necesarias para bioensayos. Al igual que en la sección anterior, se realizó un estudio de tamizaje empleando cultivos líquidos completos de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis*, pero en esta oportunidad, en búsqueda de cepas tóxicas para *A. diaperinus*. A continuación las cepas seleccionadas fueron caracterizadas fenotípica y genotípicamente. Luego se determinó la fracción del cultivo donde se encontraban los metabolitos responsables de la actividad insecticida. A su vez se realizaron bioensayos “finos” para determinar su virulencia, y evaluar como influyen en la misma la solubilización y la tripsinización *in vitro* de los cristales.

Por último se seleccionó un medio de cultivo líquido para la producción de una de las cepas en estudio, y se trabajó en el mejoramiento del mismo empleando distintos diseños estadísticos con el objeto de lograr una mayor biomasa activa. Esto resulta de importancia para el desarrollo futuro de un bioinsecticida.

### **2.1. Establecimiento de la cría de *A. diaperinus*.**

A mediados de 2012, se inició en nuestro laboratorio, una cría de *A. diaperinus* con material provisto por el Dr. Fransceschi y Vignoni de la Universidad de Luján. Las muestras donde se encontraban los ejemplares de *A. diaperinus* eran de cama de pollo (alimento balanceado para pollos y guano). Cada uno de los adultos fue separado y colocado en un recipiente plástico (35x25x10 cm). Se probaron distintos ingredientes y proporciones para conformar una dieta de soporte y alimentación: harina de maíz, salvado de trigo, germen de trigo, alimento balanceado para pollos (Ganave). Se observó un mejor desarrollo de la cría con un soporte basado en alimento balanceado para pollos (Ganave) y salvado de trigo en una proporción 95:5, con el agregado de entre dos y tres rodajas de zanahoria fresca embebidas en aceite de germen de trigo (Dasipa). Esta combinación les brindó a los insectos

una fuente de agua, humedad y aporte de vitaminas. Las zanahorias se repusieron día por medio y el soporte fue renovado semanalmente.

Las condiciones ambientales seleccionadas para la cría fueron esencialmente similares a las informadas por Francisco y do Prado (2001) (28°C, 60-70% de humedad y fotoperiodo de 14:10). Sallet *et al.* (2013) establecieron en Brasil una cría de *A. diaperinus* empleando condiciones similares a la desarrollada para este trabajo. Evaluaron dos tipos de dieta de soporte y alimentación para la cría, seleccionando el alimento balanceado para pollos como la más adecuada, al igual que la establecida en este trabajo. Las condiciones ambientales fueron las mismas, a diferencia de que rociaban diariamente las bandejas con agua, lo que resultaba en un porcentaje de humedad más elevado.

Al principio las hembras depositaban los huevos dentro del soporte donde se encontraban, lo cual hacía imposible su visualización y recolección. Para solucionar este inconveniente, se colocaron por bandeja dos tiras de papel corrugado plegadas al medio (10 cm de largo cada una), con la finalidad de que las hembras depositen los huevos dentro de ellas (Monnerat, comunicación personal). Los papeles y los huevos depositados en ellos, se recolectaron día por medio y se descontaminaron en cloruro de benzalconio 0,3% durante 30 min. Las tiras de papel con los huevos desinfectados se colocaron en recipientes nuevos incubándose en las condiciones ambientales establecidas. A partir de estos recipientes se desarrollaron poblaciones de insectos homogéneas que se utilizaron como fuente de larvas para bioensayos y para la continuidad de la cría artificial.

Esta cría de *A. diaperinus* constituye de acuerdo con nuestro conocimiento, la primera de su especie en Argentina con fines de investigación.

### **2.2. Tamizaje de cepas tóxicas para larvas del escarabajo de la cama de pollos.**

Se determinó la patogenicidad de los cultivos completos de 18 cepas nativas y 24 exóticas de *B. thuringiensis* mediante bioensayos “burdos” utilizando larvas del 2º estadio de *A. diaperinus*.

Las cepas evaluadas no resultaron ser tóxicas o presentaron porcentajes de mortalidad menores al 10%, exceptuando la cepa nativa INTA Mo4-4 y *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* que resultaron las más tóxicas (Tabla 18 y 19). Ninguna de estas dos cepas

demonstraron ser productora de  $\beta$ -exotoxina, sugiriendo que este metabolito no tendría un papel preponderante en la patogenicidad de *B. thuringiensis* para *A. diaperinus*.

**Tabla 18.** Actividad tóxica de cultivos completos de cepas nativas de *B. thuringiensis* contra larvas del 2º estadio de *A. diaperinus*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>	
		BE <sup>3</sup>	<i>thuE</i> <sup>4</sup>
INTA Mo1-12	0,0 ± 0,0	-	-
INTA H3-3	4,2 ± 3,0	+	+
INTA H4-1	8,7 ± 6,1	+	+
INTA H4-3	2,2 ± 3,1	+	+
INTA H41-1	0,0 ± 0,0	-	-
INTA Mo4-4	27,1 ± 12,6*	-	-
INTA 7-3	4,3 ± 0,0	-	-
INTA 51-3	0,0 ± 0,0	-	-
INTA Mo14-1	4,2 ± 3,0	+	+
INTA Mo14-4	2,1 ± 2,9	-	-
INTA TA21-2	0,0 ± 0,0	-	-
INTA H48-5	0,0 ± 0,0	-	-
INTA 56-4	0,0 ± 0,0	-	-
INTA 272-1	0,0 ± 0,0	-	-
INTA TA 273-8	2,1 ± 0,1	-	-
INTA 33-5	0,0 ± 0,0	-	-
INTA 77-10	0,0 ± 0,0	-	-
INTA Fr7-4	2,3 ± 0,0	-	-

<sup>1</sup> Media ± DE. \*El valor de la media corresponde a 10 repeticiones. <sup>2</sup> Detección de  $\beta$ -exotoxina. <sup>3</sup> BE: Presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -exotoxina detectada a través de bioensayos con *Musca domestica*. <sup>4</sup> *thuE*: detección del gen involucrado en la síntesis de  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante PCR.

**Tabla 19.** Actividad tóxica de cultivos completos de cepas exóticas de *B. thuringiensis* contra larvas del 2º estadio de *A. diaperinus*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad <sup>1</sup> (%)	$\beta$ -exo <sup>2</sup>	
		BE <sup>3</sup>	<i>thuE</i> <sup>4</sup>
<i>aizawai</i> HD-133	0,0 ± 0,0	-	-
<i>alesti</i> HD-4	6,5 ± 9,2	-	-
<i>asturiensis</i> 4BQ1	0,0 ± 0,0	-	-
<i>canadensis</i> HD-224	5,5 ± 7,2	-	-
<i>entomocidus</i> HD-110	4,3 ± 0,0	-	-
<i>galleriae</i> T05001	2,8 ± 3,1	-	-
<i>israelensis</i> HD-567	0,0 ± 0,0	-	-
<i>israelensis</i> IPS-82	0,0 ± 0,0	-	-
<i>japonensis</i> 4AT1	0,0 ± 0,0	-	-
<i>kumamotesis</i> 4W1	0,0 ± 0,0	-	-
<i>kurstaki</i> HD-73	0,0 ± 0,0	-	-
<i>kurstaki</i> HD-1	0,0 ± 0,0	-	-
<i>kyushuensis</i> HD-541	9,4 ± 2,5	-	-
<i>morrisoni</i> cepa			
<i>tenebrionis</i> DSM2803	10,2 ± 6,6*	-	-
<i>morrisoni</i> 4K3	2,1 ± 2,9	-	-
<i>morrisoni</i> HD-12	2,1 ± 2,9	+	-
<i>pakistani</i> 4P1	0,0 ± 0,0	-	-
<i>roskieldiensis</i> T45001	0,0 ± 0,0	-	-
<i>thompsoni</i> HD-542	2,4 ± 3,3	+	+
<i>thuringiensis</i> HD-2	0,0 ± 0,0	+	+
<i>tochigiensis</i> 4Y1	2,1 ± 2,9	-	-
<i>tolworthi</i> HD-125	8,7 ± 6,1	+	+
<i>toumanoffi</i> HD-201	6,7 ± 2,8	-	-
<i>wuhanensis</i> HD-525	4,3 ± 0,0	-	-

<sup>1</sup> Media ± DE. \*El valor de la media corresponde a 10 repeticiones. <sup>2</sup> Detección de  $\beta$ -exotoxina. <sup>3</sup> BE: Presencia (+) o ausencia (-) de  $\beta$ -exotoxina detectada a través de bioensayos con *Musca domestica*. <sup>4</sup> *thuE*: detección del gen involucrado en la síntesis de  $\beta$ -exotoxina tipo I mediante PCR.

Existen pocos reportes donde se informa la patogenicidad de *B. thuringiensis* para *A. diaperinus*. Varios de ellos son parte de patentes en las que se brindó escasa o nula información sobre los porcentajes de mortalidad obtenidos y las condiciones en que se realizaron los bioensayos (Hickel *et al.*, 1991; Hickel *et al.*, 1991a; O'Brien *et al.*, 1993). Sallet (2013) evaluó 187 cepas brasileñas de *B. thuringiensis* de las cuales destaca tres de ellas. La cepa S907, S1122 y S1806 produjeron mortalidades del 30, 50 y 60% respectivamente, utilizando una concentración final en la dieta de 400  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de *pellet* seco y molido de las mismas. En otro estudio, Alencar (2015) evaluó tres cepas de *B. thuringiensis* que produjeron mortalidades entre 55 y 61%. En ambos estudios, las cepas más tóxicas tienen en común que resultaron pertenecer al serovar *israelensis*, situación que contrasta con nuestros resultados donde ninguna de las cepas que se ensayaron pertenecientes a este serovar, resultaron patógenas (Tabla 19). Estas diferencias podrían deberse principalmente a las distintas condiciones de bioensayo utilizadas en el presente estudio.

Finalmente, la cepa nativa más tóxica *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 y la exótica *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* fueron seleccionadas para estudios posteriores.

### 2.3. Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas seleccionadas.

Las principales características fenotípicas y genotípicas de la cepa nativa INTA Mo4-4 y *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 se resumen en la tabla 20.

**Tabla 20.** Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas más tóxicas.

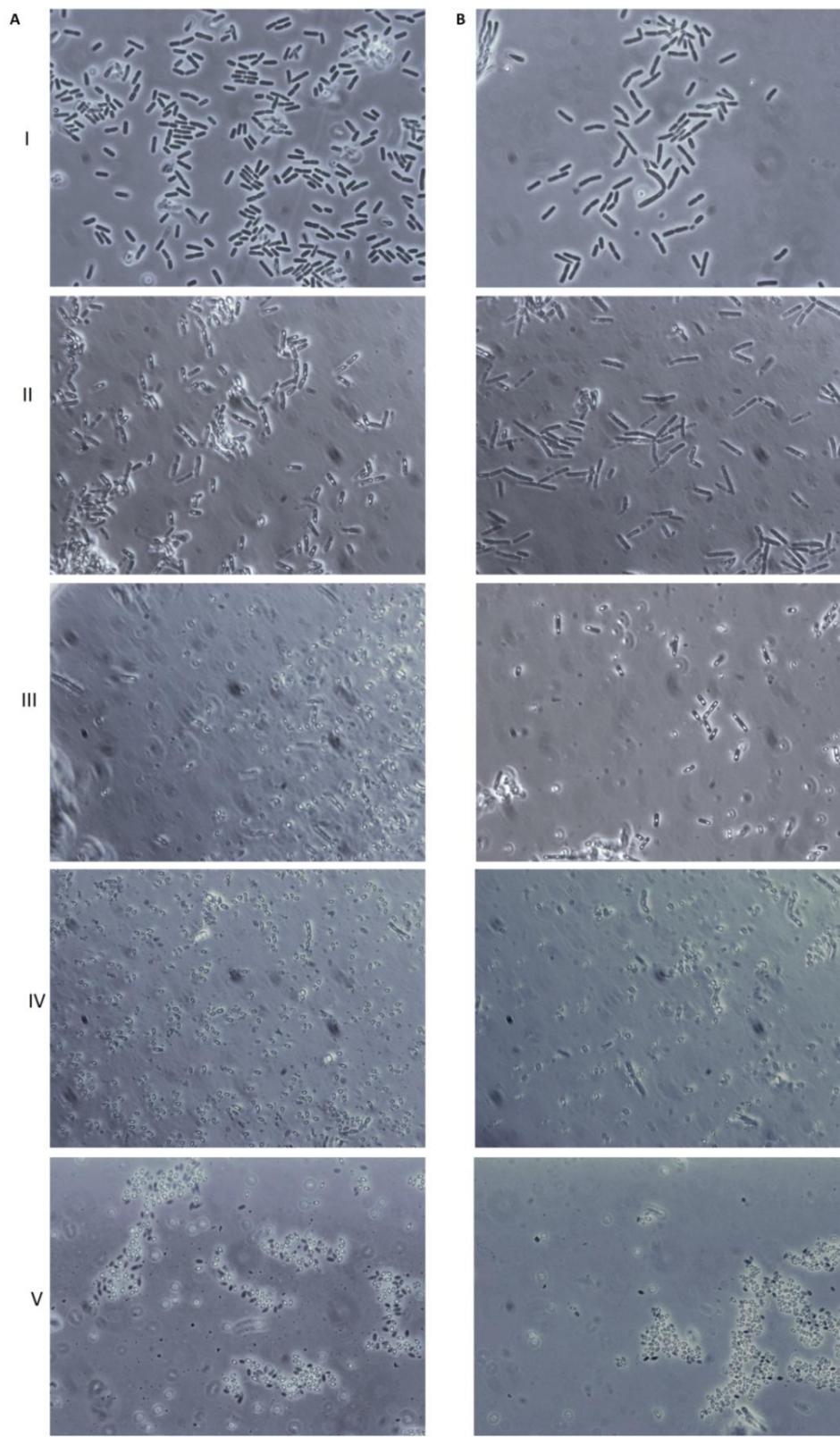
Cepa	Morfología de cristales <sup>1</sup>	Tamaño de las proteínas (kDa)	Perfil de genes <i>cry</i> y <i>vip</i>
INTA Mo4-4	CA	ca. 67 kDa	<i>cry3</i> , <i>cry23</i> , <i>cry37</i> , <i>vip1</i> y <i>vip2</i>
<i>tenebrionis</i> DSM2803	CA	ca. 67 kDa	<i>cry3</i> , <i>cry23</i> , <i>cry37</i> , <i>vip1</i> y <i>vip2</i>

<sup>1</sup>CA, cuadrados aplanados.

*B. thuringiensis* INTA Mo4-4 mostró caracteres comunes con *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis*, empleada como ingrediente activo de productos comerciales registrados para el manejo de coleópteros plagas (Srinivasa Rao *et al.*, 2015). Ambas cepas presentaron morfología similar de cristales de acuerdo a lo determinado mediante microscopia de contraste de fases (Fig. 10), cristales con perfiles proteicos similares según lo revelado por SDS-PAGE (Fig. 11), perfiles de genes *cry* y *vip* idénticos determinados por PCR (Fig. 12A, B y C) e incapacidad de producir  $\beta$ -exotoxina. Estas cepas producen cristales cuadrados aplanados y una proteína principal de *ca.* 67 kDa consistentes con la presencia de genes *cry3*.

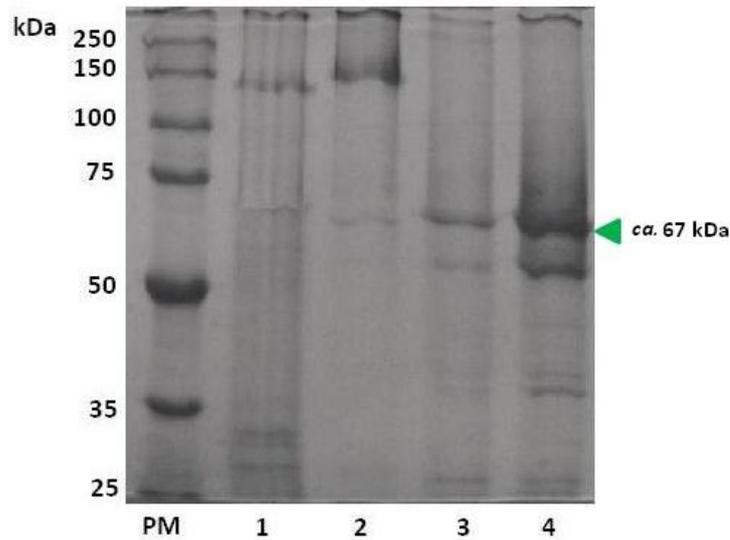
Estos cristales también estarían conformados por las proteínas Cry23 (29 kDa) y Cry37 (*ca.* 14 kDa), que actúan juntas para ejercer su toxicidad para ciertos coleópteros (de Maagd *et al.* 2003). Las bandas correspondientes a estas proteínas no se observaron en los geles de SDS-PAGE realizados (Fig. 11).

La ausencia del gen *thuE* en ambas cepas predijo su imposibilidad para secretar  $\beta$ -exotoxina de tipo I (Fig. 12D). La incapacidad de producir dicho metabolito, como la de cualquier otro tipo de  $\beta$ -exotoxina, se confirmó a través de bioensayos con *Musca domestica* (Tabla 18 y 19).



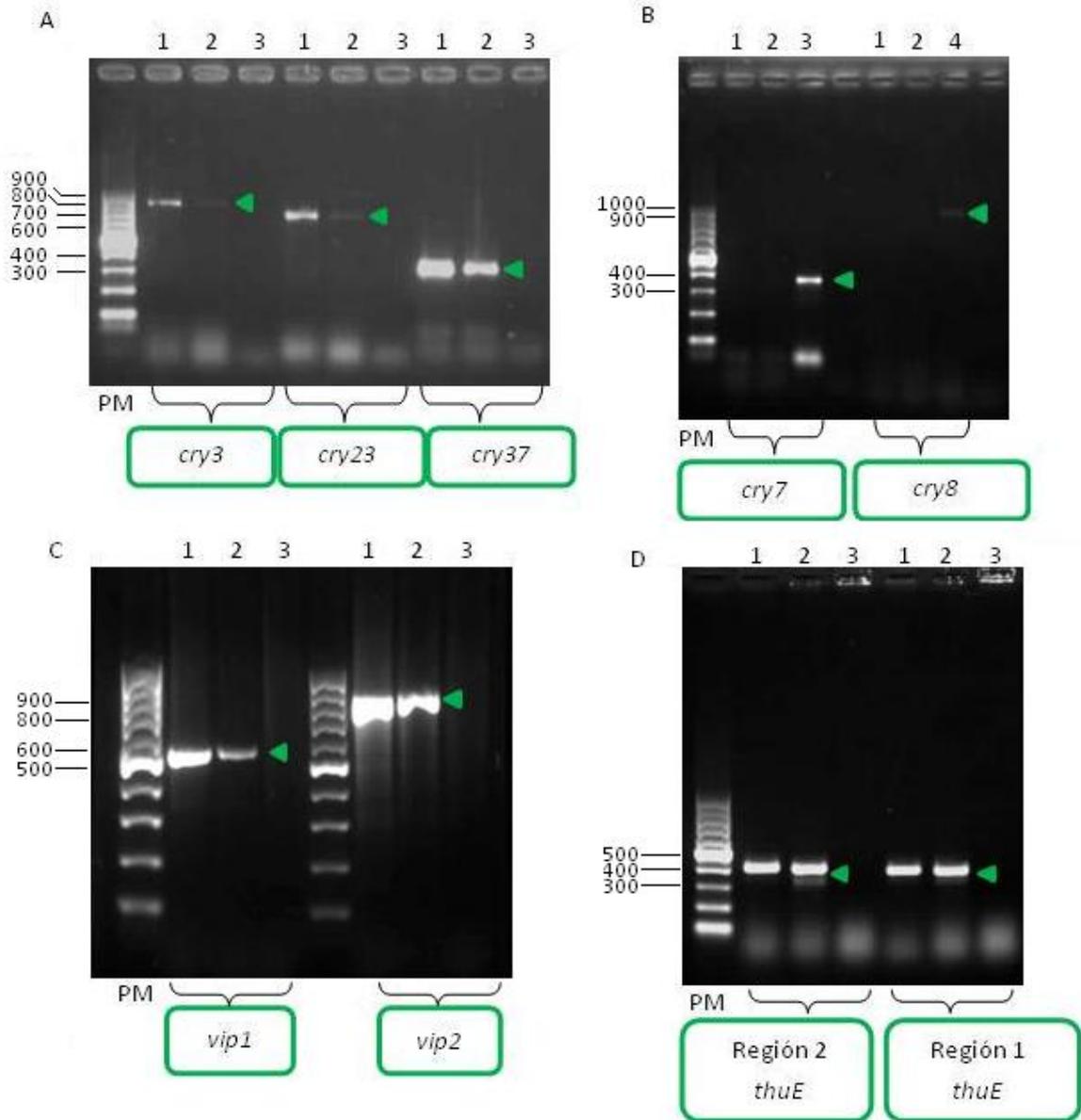
**Fig. 10.** Evolución de los cultivos bacterianos de las cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* en caldo BM empleando microscopía de contraste de fases. A) *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; B) *B. thuringiensis* INTA Mo4-4. I- 12 h: bastones en estado vegetativo; II- 24 h: comienzan

a formarse los esporangios; III- 48 h: predominio de esporangios, dentro de los que pueden llegar a distinguirse esporas y cristales; IV- 72 h: autólisis de los esporangios con esporas y cristales libres; V- 96 h: autólisis completa (esporas y cristales libres). Barra, 5  $\mu\text{m}$ .

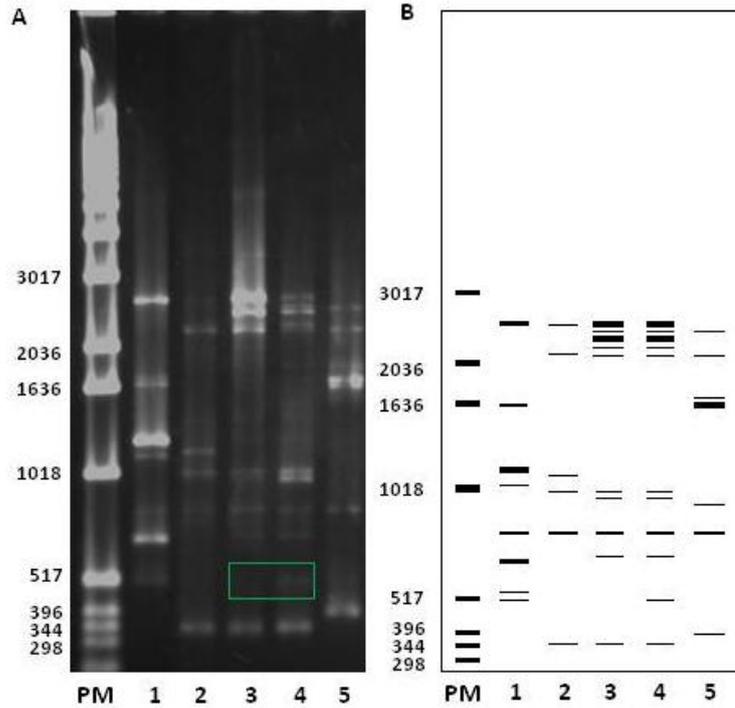


**Fig. 11.** Análisis electroforético de las proteínas que forman los cristales. Líneas: 1, *israelensis* IPS-82; 2, *kurstaki* HD-1; 3, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 4, INTA Mo4-4. PM con los tamaños indicados a la izquierda (kDa) (Promega).

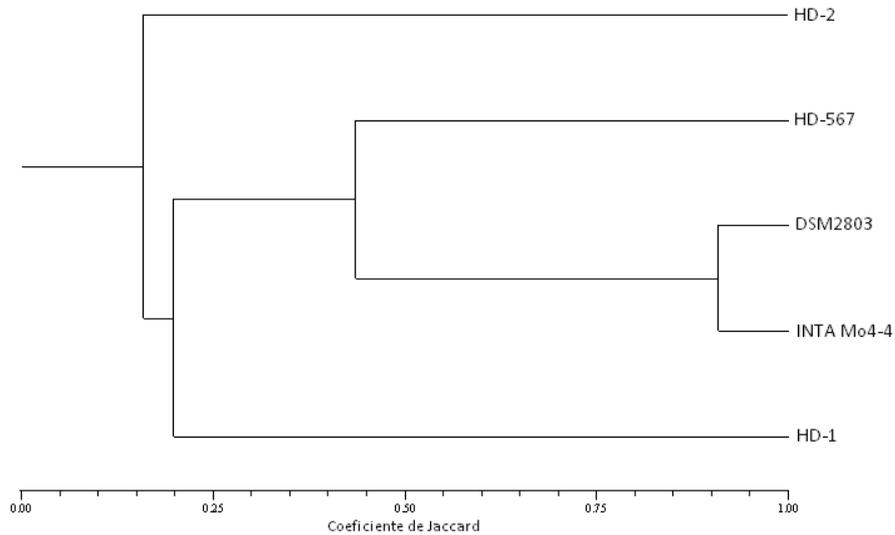
INTA Mo4-4 comparte hasta este punto, todas las características comunes de una cepa tradicionalmente coleopterocida como lo es *B. thuringiensis morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803. Sin embargo, algunas diferencias surgieron cuando se compararon los perfiles electroforéticos de REP-PCR (Fig. 13). Ambas cepas mostraron perfiles de REP-PCR muy similares que difieren en la presencia de una banda polimórfica en INTA Mo4-4 (Fig. 13). Estas similitudes sugieren que la cepa INTA Mo4-4 podría representar una variante dentro del serovar *morrisoni*. Esta capacidad de diferenciación revelada durante el desarrollo de esta técnica no es una novedad, ya que la misma ha sido utilizada con éxito en la discriminación de cepas pertenecientes a un mismo serovar (Sauka *et al.*, 2011). En la figura 14 se presenta un dendograma que confirma estos resultados.



**Fig. 12.** Detección de genes que codifican factores de virulencia. A) Amplificación génica de *cry3* (ca. 820 pb), *cry23* (702 pb) y *cry37* (330 pb). Líneas: 1, INTA Mo4-4; 2, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 3, *kurstaki* HD-1. B) *cry7* (358 pb) y *cry8* (ca. 930 pb). Líneas: 1, INTA Mo4-4; 2, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 3, *kumamotoensis* HD-867; 4, INTA Fr7-4. C) *vip1* (ca. 530 pb) y *vip2* (826 pb). Líneas: 1, INTA Mo4-4; 2, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 3, *kurstaki* HD-1. D) Región 2 (406 pb) y 1 (384 pb) de *thuE*. Líneas: 1, *thuringiensis* HD-2; 2, INTA H48-5; 3: INTA Mo4-4. Las flechas verdes indican las bandas que corresponden a los productos de amplificación esperados. PM con los tamaños indicados a la izquierda (pb) (Promega).



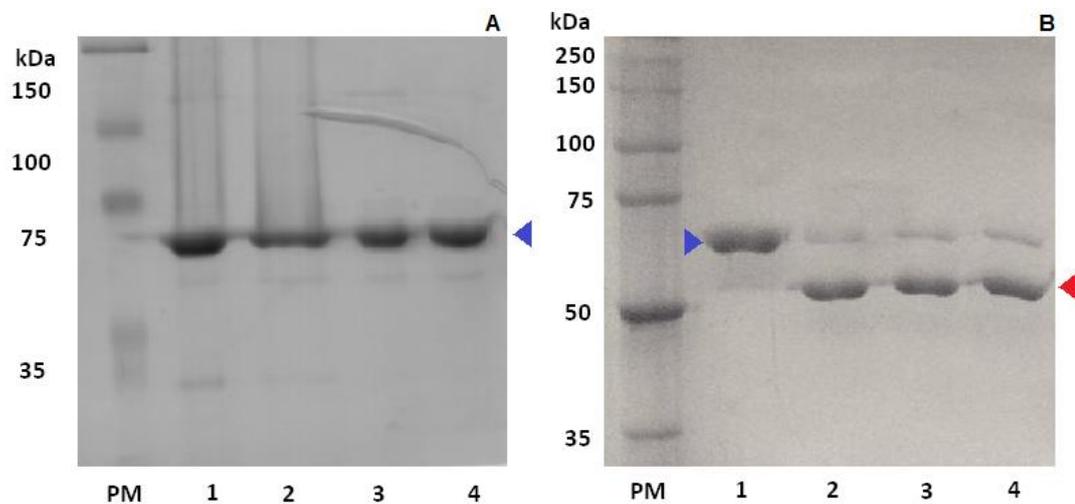
**Fig. 13.** Perfil electroforético (A) y representación esquemática (B) de INTA Mo4-4, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 y de otras cepas de *B. thuringiensis* obtenidos mediante REP-PCR. Líneas: 1, *thuringiensis* HD-2; 2, *israelensis* HD-567; 3, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 4, INTA Mo4-4; 5, *kurstaki* HD-1. PM con los tamaños indicados a la izquierda (pb) (Invitrogen).



**Fig. 14.** Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de REP-PCR obtenidos de INTA Mo4-4, *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 y de cepas de referencia de *B. thuringiensis*, empleando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA.

## 2.4. Solubilización y tripsinización de los cristales de INTA Mo4-4.

Los cristales proteicos de *B. thuringiensis* se solubilizan y degradan enzimáticamente para ejercer su efecto tóxico en el intestino medio de los insectos susceptibles (Sauka y Benintende, 2008). Se desarrollaron una serie de experimentos con el objeto de seleccionar una solución que disuelva más eficientemente los cristales de INTA Mo4-4. Se testearon soluciones de diferente composición y con valores de pH que rondaron entre 3,3 y 12,9. La cantidad de proteína total en el sobrenadante, obtenida tras la solubilización de los cristales presentes en alícuotas de *pellet* resuspendidos, fue comparada entre los distintos tratamientos a ojo desnudo en geles de SDS-PAGE (Fig. 15). Todas las soluciones probadas, independientemente de que posean un pH ácido o alcalino, disolvieron eficientemente los cristales en mayor o menor medida. Este resultado concuerda con lo informado previamente para *B. thuringiensis* *svar. morrisoni* cepa *tenebrionis* (Carroll *et al.*, 1997). Allí se concluyó que los cristales de esta cepa también pueden ser solubilizados a pH ácido o alcalino. La solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM pH 10,6 fue seleccionada por su mayor capacidad solubilizadora para ser utilizada en estudios posteriores (Fig. 15A).



**Fig. 15.** Análisis electroforético de proteínas solubilizadas (A) y solubilizadas y digeridas con tripsina (B) de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4. A) Líneas: 1, sin tratamiento; 2, NaBr 3,3 M pH 6,6; 3, NaOH 0,1 M pH 12,9; 4, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM pH 10,6. B) Líneas: 1, proteína solubilizada Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 50 mM pH 10,6; 2, 2 h; 3, 4 h; 4, 6 h. Las flechas azules indican las bandas que corresponden a la proteína solubilizada de *ca.* 67 kDa, mientras que la roja la solubilizada y tripsinizada (*ca.* 55 kDa). PM con los tamaños indicados a la izquierda (kDa) (Promega).

Distintas alícuotas de las proteínas solubilizadas en las condiciones seleccionadas fueron incubadas con tripsina durante distintos periodos de tiempo. La proteína solubilizada de *ca.* 67 kDa de INTA Mo4-4 fue tripsinizada rápidamente a una forma más pequeña de *ca.* 55 kDa (Fig. 15B). No se observaron diferencias a simple vista en la cantidad de proteína solubilizada y tripsinizada a partir de las 2 h de incubación (Fig. 15B).

## 2.5. Identificación de factores de virulencia involucrados en la toxicidad para *A. diaperinus*.

Se realizaron bioensayos con distintas fracciones del cultivo de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4, con el objetivo de determinar en cuál de ellas se encontraban los metabolitos insecticidas responsables de la toxicidad. Los resultados muestran que todas las fracciones presentaron niveles de actividad insecticida (Tabla 21).

**Tabla 21.** Actividad tóxica de las diferentes fracciones del cultivo de INTA Mo4-4.

Cepa	Mortalidad (%) <sup>1</sup>		
	CC <sup>2</sup>	P <sup>3</sup>	SF <sup>4</sup>
INTA Mo4-4	27,2 ± 12,6 <sup>a</sup>	16,2 ± 4,8 <sup>a</sup>	6,2 ± 2,9 <sup>a</sup>

<sup>1</sup>Media ± DE. <sup>2</sup>(CC) cultivo completo. <sup>3</sup>(P) *pellet* resuspendido. <sup>4</sup>(SF) sobrenadante filtrado. Los valores de las medias con igual letra indican que no difieren significativamente entre ellas ( $p > 0,05$ ).

Se compararon los valores de porcentajes de mortalidad del *pellet* (P) (esporas y cristales resuspendidos) con el del sobrenadante filtrado (SF), y ambos con respecto al del cultivo completo (CC), realizando un análisis de varianza (ANOVA) (Tabla 21). De este análisis surgió que no había diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $F=3,48$ ;  $p = 0,06$ ).

La mortalidad generada por el P fue mayor que la del SF y ambas menores que la del CC. Esto sugiere que los principales factores de toxicidad se encontrarían en el P. Esta actividad tóxica estaría dada por las proteínas Cry que formarían los cristales. Algunos autores han informado diferentes niveles de toxicidad para *A. diaperinus* por parte de proteínas típicamente coleopteridas como Cry3Aa, Cry3Bb y Cry8Ca, y por otras con actividad dual para dípteros y ciertos coleópteros como Cry4B, Cry10, Cry11A y Cyt1A (Park *et al.*, 2014; Sallet, 2013). Por lo observado durante la caracterización fenotípica y genotípica (ítem 2.3.), los cristales de INTA Mo4-4 estarían conformados principalmente por alguna proteína Cry3.

Esta clase de proteínas serían las responsables de la mayor actividad tóxica del P. En consistencia con los genes *cry* detectados por PCR, los cristales de INTA Mo4-4 podrían contener también las proteínas Cry23 y Cry37 responsables de la toxicidad para otros coleópteros (de Maagd *et al.*, 2003), las que enriquecerían la actividad tóxica total del P.

Debido a la presencia de genes *vip1* y *vip2* en INTA Mo4-4, esta cepa también podría secretar las correspondientes proteínas al medio de cultivo. Vip1 y Vip2 fueron asociadas con toxicidad para algunos coleópteros (Chakroun *et al.*, 2016). Estas proteínas podrían ser las responsables de la toxicidad del SF para *A. diaperinus*.

Sería muy interesante realizar bioensayos con proteínas individuales expresadas a partir de los genes *cry3*, *cry23*, *cry37*, *vip1* y *vip2* de INTA Mo4-4 para conocer cuáles son las más tóxicas, y también testearlas en combinaciones para entender cómo interaccionan. No obstante, se necesita más trabajo para revelar estas incógnitas.

## 2.6. Bioensayos “finos” con *A. diaperinus*.

### 2.6.1. Cuantificación de la virulencia de cepas tóxicas para *A. diaperinus* mediante ensayos de concentración letal media.

Las dos cepas de *B. thuringiensis* que resultaron ser las más tóxicas para *A. diaperinus* fueron seleccionadas para ser analizadas mediante bioensayos “finos”. Se ensayaron diluciones seriadas de *pellet* seco y molido para la estimación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) y de otros parámetros estadísticos (Tabla 4). La cepa INTA Mo4-4 resultó significativamente más tóxica para *A. diaperinus* que *B. thuringiensis* *svar.* *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 (Tabla 22).

**Tabla 22.** Análisis Probit de las cepas más tóxicas para larvas de 2° estadio de *A. diaperinus*.

Cepa	CL <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>1</sup>	CV (%) <sup>2</sup>	Pendiente	χ <sup>2</sup> (4 gl) <sup>3</sup>
<b>INTA Mo4-4</b>	136,9 (113,3-171,2) <sup>a</sup>	17,3	0,4	4,1
<b><i>tenebrionis</i> DSM2803</b>	540,5 (334,3-1838,9) <sup>b</sup>	13,5	1,4	4,0

<sup>1</sup> Concentración letal media con límites de confianza de 95%. Los valores de las medias con distintas letras presentan diferencias significativas de acuerdo al ANOVA ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup> Coeficiente de variación.

<sup>3</sup> Chi-cuadrado.

La diferencia en la virulencia de ambas cepas podría deberse a distintos niveles de expresión de genes *cry*, a pesar de que mostraron compartir perfiles génicos idénticos, y a la presencia posible de otros factores de virulencia desconocidos o conocidos no buscados en este trabajo. Todo esto hace que la actividad biológica de una cepa de *B. thuringiensis* no pueda ser predicha completamente en base a su contenido de genes *cry* y *vip* obtenidos por PCR (Porcar y Juárez-Pérez, 2003; Sauka, 2007).

Se estimó la cantidad de proteínas totales presentes en 1 mg de *pellet* seco y molido solubilizado de INTA Mo4-4 en 612  $\mu\text{g}$  (ver ítem 6.3.1. - “Materiales y métodos”). Se supone que la producción de proteínas totales es proporcional a la producción de proteínas Cry en los cristales. Por otro lado, se estimó que 578  $\mu\text{g}$  de estas proteínas totales serían Cry3 utilizando el método de cuantificación en gel (ver ítem 6.3.2. - “Materiales y métodos”). El resto podría corresponder a proteínas Cry23 y Cry37 que se encontrarían también formando los cristales, y a proteínas de la espora, entre otras. Teniendo en cuenta estos datos, de los 136,9  $\mu\text{g}/\text{ml}$  estimados para que INTA Mo4-4 cause el 50% de mortalidad en la población de *A. diaperinus* ensayada, unos 132,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  serían de proteína Cry3. Park *et al.* (2014) presentaron valores de  $\text{CL}_{50}$  de 9,58  $\mu\text{g}$  Cry3Aa/ $\text{cm}^2$  y 26,52  $\mu\text{g}$  Cry3Bb/ $\text{cm}^2$  para *A. diaperinus*. Estos datos no son comparables con los obtenidos en el presente trabajo debido a que emplearon una metodología de bioensayos de contaminación en superficie en lugar de incorporación en dieta.

Por todo lo expuesto, *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 constituye la mejor para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nativo nuevo destinado al manejo de larvas del escarabajo de la cama de pollos.

### **2.6.2. Efecto de la solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales de INTA Mo4-4 sobre la actividad tóxica para *A. diaperinus*.**

Se cuantificó la virulencia del *pellet* seco y molido de INTA Mo4-4 para *A. diaperinus*, sometido a un proceso de solubilización (PS), y de solubilización y posterior digestión con tripsina (PST) *in vitro* (Tabla 23). Luego, se compararon los valores de  $\text{CL}_{50}$  obtenidos con el de INTA Mo4-4 sin tratar (P) realizando un análisis de varianza (ANOVA). De este análisis surgió que no existían diferencias significativas entre los tres tratamientos ( $F=1,37$ ;  $p = 0,32$ ) (Tabla 23).

**Tabla 23.** Análisis Probit de la biomasa activa de la cepa INTA Mo4-4 sometida a distintos tratamientos.

Tratamiento <sup>1</sup>	CL <sub>50</sub> (µg/ml) <sup>2</sup>	CV (%) <sup>3</sup>	Pendiente	$\chi^2$ (4 gl) <sup>4</sup>
P	136,9 (113,3-171,2) <sup>a</sup>	17,3	0,4	4,1
PS	158,4 (117,7-251,0) <sup>a</sup>	16,3	1,6	3,2
PST	164,5 (125,1-246,2) <sup>a</sup>	12,9	1,7	4,4

<sup>1</sup> P: *Pellet* seco y molido sin tratar; PS: *Pellet* seco, molido y solubilizado; PST: *Pellet* seco, molido, solubilizado y tripsinizado. <sup>2</sup> Concentración letal media con límites de confianza de 95%. Los valores de las medias con igual letra indican que no difieren significativamente entre ellas ( $p > 0,05$ ). <sup>3</sup> Coeficiente de variación. <sup>4</sup> Chi-cuadrado.

Se cree que el ambiente neutro a ácido que en general existe en el interior del intestino medio de los coleópteros no permitiría la completa solubilización de los cristales, y la posterior activación de la toxina (de Maag *et al.*, 2001; Sharifi *et al.*, 2012). Esto se traduciría, como es de esperar, en una menor susceptibilidad del insecto blanco a *B. thuringiensis*. No obstante, de acuerdo a lo observado en la tabla 23, la virulencia de INTA Mo4-4 no se vio modificada significativamente con los distintos tratamientos. Estos resultados nos permiten inferir que la solubilización de los cristales de INTA Mo4-4 y la posterior activación de las toxinas que contienen, serían procesos que se darían naturalmente en el interior de las larvas de *A. diaperinus* haciéndolos susceptibles a esta cepa de *B. thuringiensis*. Esta hipótesis se vió reflejada en los resultados obtenidos por Sallet (2013), quien observó *in vitro* que la proteína Cry3A era activada de igual manera por tripsina como por las proteasas presentes en el jugo intestinal de *A. diaperinus*. En éste podrían estar presentes otras enzimas o surfactantes que participarían en este proceso de forma sinérgica (Martin y Martin, 1984).

## 2.7. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa de INTA Mo4-4.

La virulencia de la biomasa (cristales y esporas) de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 para larvas de *A. diaperinus*, condiciona a esta cepa como candidata para la elaboración de un bioinsecticida. Por lo tanto se requiere de un medio de cultivo apropiado para su producción, en el que la misma produzca grandes cantidades de cristales proteicos que sean

capaces de generar un valor de toxicidad del nivel requerido. En esta etapa del estudio, se seleccionó un medio de cultivo líquido para la producción de INTA Mo4-4, y se trabajó en el mejoramiento del mismo empleando distintos diseños estadísticos, con el objeto de lograr mayor biomasa activa, tomando como parámetro de medida principal la mayor concentración de proteínas producidas.

### 2.7.1. Selección de un medio de cultivo líquido.

Se evaluaron distintos medios de esporulación de *B. thuringiensis* reportados en la bibliografía (Caldo K, Caldo T y Caldo A), y se los comparó con un caldo formulado en el laboratorio (Caldo BM) (ver ítem 8.2. - “Materiales y métodos”). Sólo en los caldos BM y A se logró una esporulación superior al 99% tras la observación de una alícuota bajo microscopio de contraste de fases, luego de 96 y 120 h de cultivo respectivamente. En el resto se observaron porcentajes de esporulación entre un 50 y 70% tras 120 h de incubación. Esto sugiere que esos caldos no eran propicios para la esporulación de INTA Mo4-4 dentro de un periodo de tiempo lógico de cultivo, por lo que se concluye que el crecimiento de las bacterias no fue el adecuado para la obtención de los cristales.

En base a los parámetros de medición y el análisis de los resultados presentados en la tabla 24, se seleccionó al caldo BM para continuar los estudios, en base a una mayor producción de proteínas totales.

**Tabla 24.** Mediciones de densidad óptica, pH y cuantificación de proteínas de INTA Mo4-4 en caldos de esporulación.

Medio	DO <sup>1</sup>	pH	Proteínas (µg/ml)
Caldo A	1,7	6,7	131,3
Caldo BM	1,7	7,7	220,1

<sup>1</sup> Densidad óptica.

Luego se comparó el crecimiento de INTA Mo4-4 en caldo BM y en caldo BM con almidón soluble en su composición. En ambos medios se observó un porcentaje de esporulación superior al 99% tras 96 h de incubación. Se seleccionó el caldo BM con almidón soluble para

los estudios posteriores de mejoramiento, debido a que demostró una producción mayor de proteínas totales y un recuento de esporas mayor que el caldo BM (Tabla 25).

**Tabla 25.** Mediciones de densidad óptica, pH, cuantificación de proteínas y recuento de esporas de INTA Mo4-4 en caldo BM y caldo BM con almidón soluble.

Medio	DO <sup>1</sup>	pH	Proteínas (µg/ml)	UFC/ml <sup>2</sup>
Caldo BM	1,7	7,7	220,1	3,6 x 10 <sup>6</sup>
Caldo BM con almidón	1,9	7,4	242,8	2,6 x 10 <sup>7</sup>

<sup>1</sup> Densidad Óptica. <sup>2</sup> Unidades Formadoras de Colonias.

### 2.7.2. Determinación de los componentes del medio que son importantes para la producción de proteínas del cristal.

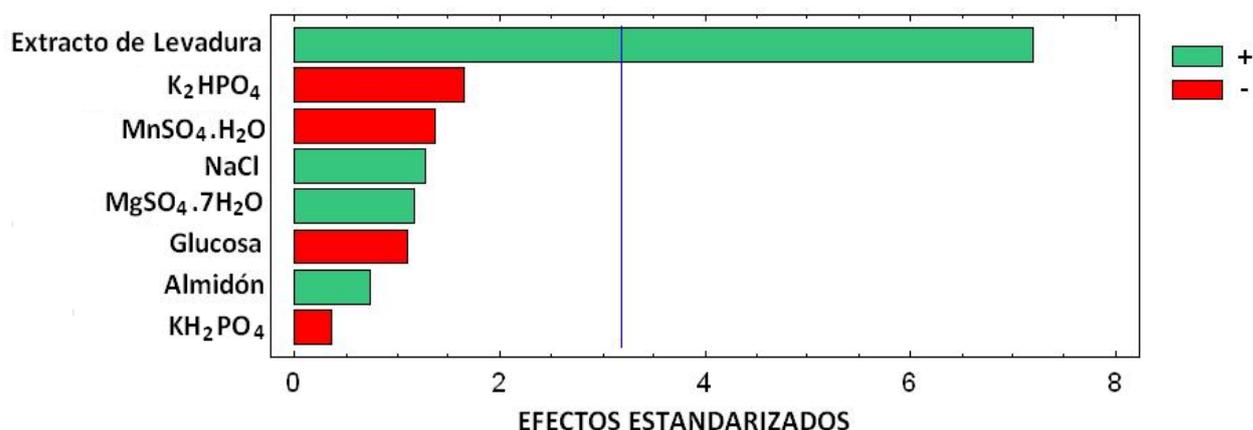
Se empleó un diseño de Plackett-Burman de 12 experimentos para determinar cuáles de los ocho componentes del caldo BM con almidón soluble, afectaban significativamente la producción de proteínas de la biomasa activa de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4. En la tabla 26 se presentaron los valores de proteínas totales obtenidos tras la cuantificación.

**Tabla 26.** Valores de la concentración de proteínas experimental y predicha en los medios diseñados por Plackett-Burman.

Medio	Respuesta experimental (µg/ml)	Respuesta predicha (µg/ml)
1	68,1	86,4
2	186,6	182,1
3	62,3	70,0
4	203,0	187,9
5	216,5	198,2
6	118,0	133,1
7	101,8	94,1
8	91,2	95,7
9	199,2	203,7
10	210,7	229,1

<b>11</b>	100,8	93,1
<b>12</b>	77,7	62,5

El análisis estadístico determinó que el extracto de levadura ( $E=7,19$ ;  $p = 0,006$ ) es el único componente que mostró un efecto positivo y significativo sobre la producción de proteínas. El resto de los componentes no mostraron un efecto significativo ( $p \leq 0,05$ ):  $K_2HPO_4$  ( $E=-1,64$ ;  $p = 0,20$ ),  $MnSO_4 \cdot H_2O$  ( $E=-1,36$ ;  $p = 0,27$ ),  $NaCl$  ( $E=1,27$ ;  $p = 0,29$ ),  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  ( $E= 1,16$ ;  $p = 0,33$ ), Glucosa ( $E=-1,10$ ;  $p = 0,27$ ), Almidón soluble ( $E=0,73$ ;  $p = 0,52$ ), y  $KH_2PO_4$  ( $E=-0,35$ ;  $p = 0,75$ ). En la figura 16 se observa el gráfico de Pareto donde se encuentran representados cada uno de los componentes del medio con su efecto estandarizado ( $E$ =estadístico t) y en distintos colores si afectan positivamente o negativamente la producción de proteínas.



**Fig. 16.** Gráfico de Pareto con los efectos estandarizados de cada uno de los componentes del caldo BM con almidón soluble. Nivel de significancia del 5%.

Como se mencionó anteriormente, el efecto del extracto de levadura sobre la producción de proteínas de INTA Mo4-4 fue significativo y positivo. Esto sugiere que a medida que aumenta la concentración del mismo en el medio, la concentración de proteínas en la biomasa también aumenta. El extracto de levadura es fundamentalmente la fuente de nitrógeno del medio, un componente esencial para la síntesis de proteínas, por lo que no constituye una rareza lo observado. Existen varias citas donde se describieron los efectos significativos y positivos de la fuente de nitrógeno en la producción de proteínas cristalinas

insecticidas de distintas cepas de *B. thuringiensis* (Anderson y Jayaraman, 2003; Avignone-Rossa *et al.*, 1990; Ben Khedher *et al.*, 2011).

La glucosa y el almidón soluble son las fuentes de carbono presentes en el medio. La primera en metabolizarse sería la glucosa, ya que es una molécula simple y requiere menos energía para ese proceso. Un dato que sobresale tras el análisis de este gráfico es que la glucosa mostró un efecto negativo (aunque no significativo), o sea que a medida que la concentración de glucosa aumentaba la concentración de proteínas disminuía. Se conoce que a concentraciones elevadas de glucosa el proceso de esporulación y la síntesis de proteínas se ven afectados (Avignone-Rossa *et al.*, 1990; Yang *et al.*, 1998). Esto puede deberse a que a concentraciones altas de glucosa, varios operones involucrados en la síntesis de proteínas Cry podrían verse reprimidos (Magasanik *et al.*, 1987). Por otro lado, el efecto positivo (aunque no significativo) del almidón soluble podría relacionarse con que este azúcar es metabolizado más lentamente que la glucosa. El almidón ejercería un efecto represivo menor que la glucosa sobre los mencionados operones.

Teniendo en cuenta estos resultados, el extracto de levadura fue seleccionado como una variable para continuar con los estudios de mejoramiento del medio. También se seleccionó al almidón soluble por ser una fuente de carbono, con efecto positivo aunque no significativo sobre la producción de proteínas. Sabiendo además que las proporciones de C:N en los medios de cultivo son importantes para el crecimiento normal de *B. thuringiensis* y la producción de proteínas Cry (Ertola, 1987), y considerando que el análisis de Plackett-Burman sólo detecta efectos principales sin tener en cuenta interacciones (Plackett y Burman, 1946), resultó de interés avanzar en el estudio de la interacción entre ambos componentes.

### **2.7.3. Análisis de superficie de respuesta.**

Los dos componentes seleccionados fueron optimizados utilizando un diseño central compuesto rotatorio (DCC). En la tabla 27 se presentaron los valores experimentales y predichos de la concentración de proteínas de los 12 medios diseñados.

**Tabla 27.** Valores de la concentración de proteínas experimental y predicha de los medios diseñados por DCC.

Medio	Respuesta experimental ( $\mu\text{g/ml}$ )	Respuesta predicha ( $\mu\text{g/ml}$ )
1	127,1	110,4
2	127,1	119,1
3	242,1	243,0
4	64,0	78,2
5	163,1	176,9
6	237,6	239,0
7	230,7	223,5
8	192,4	193,9
9	228,5	219,5
10	199,2	219,5
11	224,0	219,5
12	226,2	219,5

Se obtuvo la siguiente ecuación polinómica de segundo orden, que define la respuesta predicha (concentración de proteínas estimada) en función de las variables independientes ( $X_1$ = extracto de levadura y  $X_2$ = almidón soluble):

$$Y = 219,485 + 58,255X_1 + 6,041X_2 - 29,440X_1^2 - 17,040X_2^2 + 1,715X_1X_2$$

Teniendo en cuenta los coeficientes de regresión y los correspondientes valores de  $t$  (Tabla 28), sólo el efecto lineal del extracto de levadura ( $X_1$ ) mostró ser significativo ( $p < 0,05$ ) en la producción de proteínas. Por otra parte, la interacción entre el extracto de levadura y el almidón soluble ( $X_1X_2$ ) no resultó significativa a un nivel del 5%.

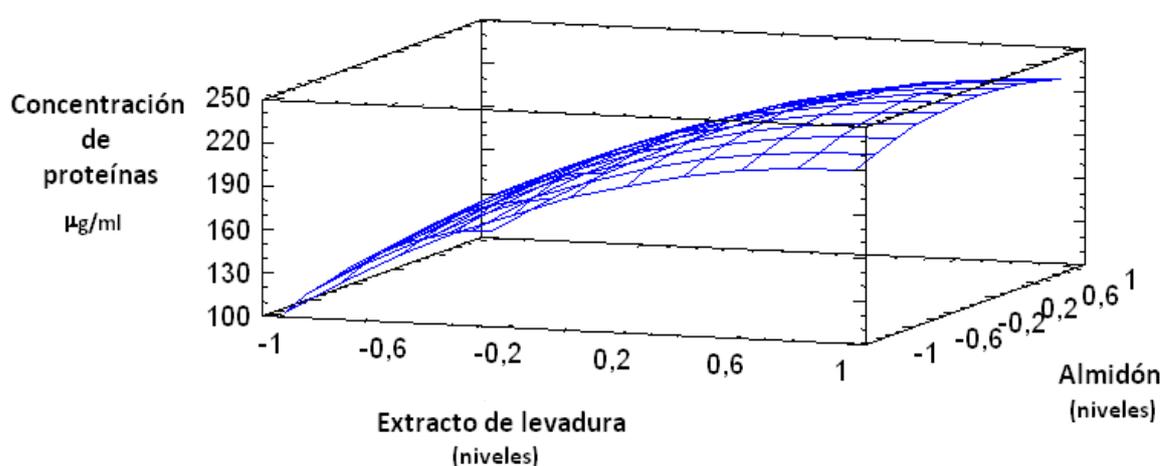
**Tabla 28.** Resultados del análisis de regresión y valores  $t$  y  $p$  correspondientes al modelo de segundo orden para el mejoramiento de la producción de proteínas.

Variables	Coefficiente de regresión	Error estándar	$t$ -valor	Prueba F	$p$ -valor
$X_1$	58,255	5,302	10,986	120,70	<0,0001 <sup>a</sup>
$X_2$	6,041	5,302	1,139	1,30	0,2980
$X_1^2$	-29,440	5,928	-4,965	24,70	0,0025 <sup>a</sup>
$X_2^2$	-17,040	5,928	-2,874	8,26	0,0283 <sup>a</sup>
$X_1X_2$	1,715	7,498	0,229	0,05	0,8267

<sup>a</sup> Nivel de significancia del 5%.

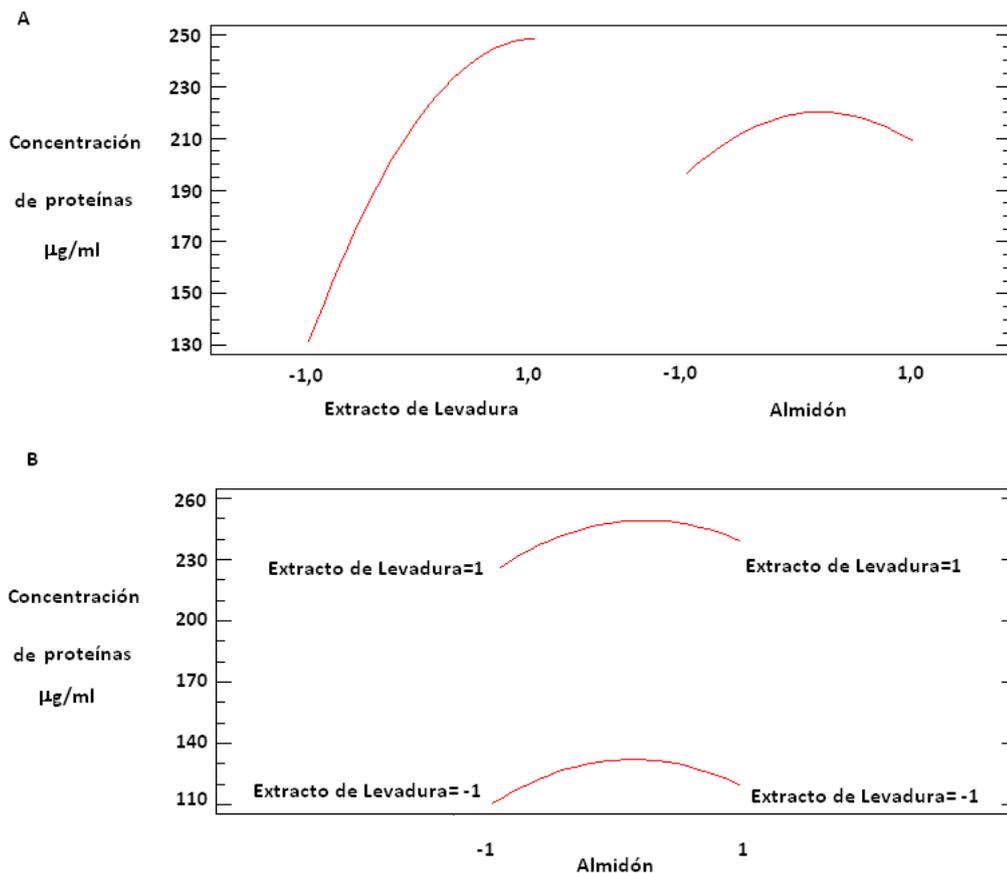
La interpretación de un valor de  $R^2$  ajustado de 0,9297 nos indicó, que el modelo explica el 93% de la variabilidad en la respuesta, lo que significa un buen ajuste. A su vez la prueba de falta de ajuste presentó un  $p$  valor  $> 0,05$  ( $p = 0,3916$ ), mostrando también un buen ajuste del modelo.

Se puede observar en el modelo estimado que como ambos términos cuadráticos son negativos existe un máximo dentro del área experimental seleccionada (Fig. 17). Los efectos simples presentaron el mismo signo (positivo) (Tabla 28). Esto evidenció que a medida que aumentaban los niveles de estas variables aumentaba la producción de proteínas (Fig. 17).



**Fig. 17.** Gráfico de superficie de respuesta estimada del DDC mostrando la interacción de los niveles de extracto de levadura y almidón soluble sobre la producción de proteínas obtenidas.

Los efectos simples del extracto de levadura y almidón soluble, y sus interacciones sobre la producción de proteínas obtenida pudo visualizarse más claramente en la figura 18. El análisis de lo presentado en esta figura ayuda a confirmar observaciones anteriores. Se observó que la producción de proteínas aumentaba a medida que se aumentaba la concentración del extracto de levadura, hasta alcanzar un máximo. La producción de proteínas obtenida en este punto fue significativamente mayor que la obtenida cuando el nivel del extracto de levadura era mínimo (Fig. 18A). Se observó que a medida que se aumentaban los niveles de almidón soluble la producción de proteínas también llegaba a un máximo, pero en este caso, para comenzar a disminuir rápidamente (Fig. 18A). Por otro lado, esto mismo se observó para el almidón soluble, independientemente del nivel de extracto de levadura empleado. Sin embargo, la producción de proteínas fue obviamente máxima cuando el nivel de extracto de levadura fue mayor (Fig. 18B).



**Fig. 18.** Efectos simples e interacciones del DCC frente a la concentración de proteínas. A) Efectos simples del extracto de levadura y almidón a distintos niveles. B) Efecto de la interacción entre las variables a diferentes niveles. Los dos componentes están representados en los niveles probados en el diseño.

### 2.7.4. Confirmación del mejoramiento del medio de cultivo.

*Bacillus thuringiensis* INTA Mo4-4 fue cultivado en el caldo BM basal y en el caldo mejorado con la finalidad de verificar la contribución significativa de este último en la producción de proteínas Cry. Tras realizar el análisis del DCC, se determinó que los valores de extracto de levadura y almidón solubles necesarios para alcanzar un máximo en la producción de proteínas serían 6,0 g/l y 2,8 g/l respectivamente. Se estimó bajo estas condiciones una producción de proteínas de 249,2 µg/ml.

La concentración de proteínas y otros parámetros de interés medidos, obtenidos experimentalmente a partir del medio basal y su comparación con el medio mejorado se presentaron en la tabla 29.

**Tabla 29.** Comparación de la producción de proteínas y otros parámetros medidos, obtenidos a partir del cultivo de INTA Mo4-4 en el medio basal y el mejorado.

Medio	Proteínas totales (µg/ml) <sup>1</sup>	pH	DO <sup>2</sup>	UFC <sup>3</sup> (10 <sup>6</sup> /ml)
Basal	153,4 ± 11,2 <sup>a</sup>	7,2 ± 0,0	1,96 ± 0,01	6,4 ± 2,3 <sup>a</sup>
Mejorado	296,6 ± 9,2 <sup>b</sup>	8,0 ± 0,1	2,13 ± 0,03	2,9 ± 0,8 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Las concentraciones de proteínas totales en cada medio son una media de 3 repeticiones. Los valores de las medias con distintas letras presentan diferencias significativas de acuerdo al ANOVA ( $p < 0,05$ ). <sup>2</sup> Densidad Óptica. <sup>3</sup> Unidades Formadoras de Colonias.

La producción de proteínas alcanzada experimentalmente fue mayor que la predicha por el modelo. Los resultados experimentales mostraron que la producción de proteínas aumentó significativamente en comparación con la obtenida en el medio basal, luego del mejoramiento utilizando la metodología de superficie de respuesta. El mejoramiento de la producción de proteínas fue del 93,4% con respecto al medio basal, lo que implicó casi la duplicación de la concentración obtenida. Por el contrario, el recuento de UFC en el medio mejorado disminuyó significativamente con respecto al medio basal, observándose una correlación negativa entre la producción de proteínas y el crecimiento celular. Estos resultados concuerdan con observaciones previas de otros autores (Anderson y Jayamaraman, 2003; Ben Khedher *et al.*, 2011). Utilizando los datos presentados en la tabla 11, se calculó la relación entre la concentración de proteínas totales y el número de UFC/ml

obtenido en cada medio de cultivo. Se obtuvieron relaciones de 8,4 µg de proteína/UFC para el medio mejorado y de 2,8 µg de proteína/UFC para el medio basal. La concentración mayor de proteínas por UFC para el medio mejorado podría estar relacionada con un aumento en el tamaño de los cristales. Esto podría asociarse con cambios en la expresión de genes *cry*, relacionados con la disponibilidad de energía para la síntesis de las proteínas correspondientes (Bravo *et al.*, 1993).

Por último, se realizaron ensayos “burdos” con larvas de *A. diaperinus* para comparar la toxicidad de alícuotas de cultivos completos del medio basal y del medio mejorado. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas entre los porcentajes de mortalidad obtenidos a partir de ambos medios (Tabla 30). Este aumento significativo en la producción de proteínas en el medio mejorado con respecto al basal, se tradujo en un aumento significativo en el grado de toxicidad (Tabla 30).

**Tabla 30.** Actividad tóxica de INTA Mo4-4 cultivada en el medio basal y en el medio mejorado, frente a larvas de 2º estadio de *A. diaperinus*.

Medio	Mortalidad (%) <sup>1</sup>
Basal	12,7 ± 7,0 <sup>a</sup>
Mejorado	23,9 ± 7,4 <sup>b</sup>

<sup>1</sup> Medio ± DE. Los valores de las medias con distintas letras presentan diferencias significativas de acuerdo al ANOVA ( $p < 0,05$ ).

En resumen, se seleccionaron una cepa nativa y una exótica de *B. thuringiensis* como las más tóxicas para larvas de *A. diaperinus*. De ellas, la cepa nativa INTA Mo4-4 se constituyó como la mejor opción para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nuevo, destinado al manejo de larvas del escarabajo de la cama de pollos. Esta afirmación radica en que presentó mayor virulencia que la cepa exótica y en que no es productora de  $\beta$ -exotoxina. A su vez se mejoró un medio de cultivo propicio para su producción, en el que se lograron concentraciones de proteínas con actividad insecticida considerable.



# *Conclusiones*



## Conclusiones

Estos estudios han permitido seleccionar cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de dos coleópteros de gran impacto en el Sector Agropecuario, identificar los factores de virulencia principales involucrados en sus mecanismos de acción y avanzar en el mejoramiento de un medio de cultivo para la producción de una cepa nativa. Los resultados obtenidos significan aportes sustanciales al desarrollo de tecnologías destinadas al manejo de estas plagas. Se destacan a continuación las siguientes conclusiones:

### **Sección 1: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Anthonomus grandis*.**

- ✓ El factor de virulencia más importante en las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas como las más tóxicas para larvas de *A. grandis* sería la  $\beta$ -exotoxina, por lo que el uso de las mismas para la elaboración de un bioinsecticida de primera generación debe evitarse.
- ✓ Las características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas tóxicas para el picudo del algodón se asemejaron más a los caracteres típicos de cepas de *B. thuringiensis* lepidopteridas que a los de cepas coleopteridas.
- ✓ Estas cepas mostraron perfiles electroforéticos de REP-PCR idénticos a la cepa de referencia HD-1, lo que indicaría su pertenencia al serovar *kurstaki*.
- ✓ Existirían factores de virulencia termolábiles en el sobrenadante de las cepas tóxicas para *A. grandis*, los que en las cepas *B. thuringiensis* INTA H4-3 e INTA H48-5 contribuirían significativamente en la virulencia manifestada por la  $\beta$ -exotoxina.
- ✓ Las cepas seleccionadas podrían ser fuente de genes (ej: *cry11a*) para la producción de plantas de algodón transgénicas con resistencia a *A. grandis*.

**Sección 2: Selección y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de *Alphitobius diaperinus*. Mejoramiento de un medio de cultivo para obtener una mayor biomasa activa.**

- ✓ La cepa nativa *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 se constituyó como la mejor opción para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nuevo destinado al manejo de larvas del escarabajo de la cama de pollos, ya que presentó mayor virulencia que *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 y a que no produce  $\beta$ -exotoxina.
  
- ✓ La cepa *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 podría representar una variante dentro del serovar *morrisoni*, ya que mostró mantener una relación filogenética cercana con la cepa de referencia *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 y a que comparte con ésta caracteres fenotípicos y genotípicos principales.
  
- ✓ Las proteínas Cry3, y las Vip1 y Vip2 en menor medida, serían las principales responsables de la virulencia de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 para larvas de *A. diaperinus*.
  
- ✓ La solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 no influirían significativamente sobre su virulencia para *A. diaperinus*.
  
- ✓ Las condiciones intestinales de *A. diaperinus* serían las propicias para la solubilización y activación de las proteínas Cry de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4.
  
- ✓ El caldo BM con almidón soluble resultó un medio propicio para la producción de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4 debido a que fue en el que se logró una mayor producción de proteínas totales.

- ✓ El extracto de levadura constituye un componente importante del caldo BM que influyó significativamente y positivamente en la producción de proteínas de *B. thuringiensis* INTA Mo4-4.
- ✓ Se logró mejorar significativamente la producción de proteínas insecticidas en *B. thuringiensis* INTA Mo4-4, modificando las concentraciones de algunos de los componentes del caldo BM, lo que se tradujo en un aumento significativo de la toxicidad para *A. diaperinus*.



# *Referencias*



## Referencias

- Agaisse, H.; Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriol. 177: 6027-32.
- Ahmad, P.; Ashraf, M.; Younis, M.; Hu, X.; Kumar, A; Akram, N.; Al-Qurainy, F. 2012. Role of transgenic plants in agriculture and biopharming. Biotechnol. Adv. 30: 524-40.
- Alencar, R. 2015. Associação de pós vegetais e *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis doctoral. Universidad e Tecnológica Federal Do Paraná.
- Alonso, E. 1983. Manual fitosanitario de los principales cultivos de la región lagunera. (Ed). Unidad de capacitación y divulgación. SARH. Lerdo Dgo. P. 11-3.
- Alves, L.; Buzarello, G.; Oliveira, D.; Alves, S. 2005. Patogenicidade de *Steinernema glaseri* e *S. carpocapse* (Nematoda: Rhabdita) contra o cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). Neotrop. Entomol. 34: 139-41.
- Amadio, A.; Navas, L.; Sauka, D.; Berretta, M.; Benintende, G.; Zandomeni, R. 2013. Identification, cloning and expression of an insecticide *cry8* gene from *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 23: 401-9.
- Anderson, R.; Jayaraman, K. 2003. Influence of carbon and nitrogen sources on the growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *galleriae* for biopesticide production. Chem. Biochem. Eng. Q. 17: 225-31.
- Arcas, J. 1985. Producción de bioinsecticidas. Tesis doctoral. UNLP.
- Armengol, G.; Escobar, M.; Orduz, S. 2007. Diversity of Colombian strains of *Bacillus thuringiensis* with insecticidal activity against dipteran and lepidopteran insect. J. Appl. Microbiol. 102: 77-88.
- Avignone Rossa, C.; Yantorno, O.; Arcas, J.; Ertola, R. 1990. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin production. World J. Microbiol. Biotechnol. 6: 27-31.
- Avignone-Rossa, C.; Arcas, J.; Mignone, C. 1992. *Bacillus thuringiensis* growth, sporulation and  $\delta$ -endotoxin production in oxygen limited and non-limited cultures. World. J. Microb. Biotechnol. 8: 301-4.
- Ávila, V.; Terán, V. 1993. Las plagas de los cultivos agrícolas del sur de Tamaulipas. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental Sur de Tamaulipas. Folleto Técnico Núm. 8. Tampico Tamaulipas, México. P. 57.

- Beebee, T.; Korner, A.; Bond, R. 1972. Differential inhibition of mammalian ribonucleic acid polymerase by an exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. The direct observation of nucleoplasmic ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei. *Biochem. J.* 127: 619-34.
- Ben Khedher, S.; Jaoua, S. 2011. Improvement of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strains in response to various stresses in low cost medium. *Curr. Microbiol.* 62: 1467-77.
- Benintende, G.; Cozzi, J. 1996. Actividad insecticida de distintas fracciones de cultivos líquidos de *Bacillus moritai* (Aizawa y Fujiyoshi) en *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *RIA.* 27: 27-32.
- Benintende, G.; Sauka, D.; Cozzi, J. 2005. Formulación sólida de *Bacillus thuringiensis* de alta eficacia. En Actas 9° SICONBIOL, Recife, Pernambuco, Brasil. P. 46.
- Bergamasco, V.; Gonçalves, J.; Polanczy, R.; Desidério, J.; Lemos M. 2011. Expression of a new *Bacillus thuringiensis cry1Ia* gene in *Escherichia coli* with strong activity against cotton pests. *Aus. J. Basic Appl. Sci.* 5: 526-33.
- Bernhard, K. 1986. Studies on the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 33: 261-5.
- Bernhard, K.; Utz, R. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. En: Entwistle, P.; Cory, J.; Bailey, M.; Higgs, S. (ed.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental pesticide: theory and practice. P. 255-68.
- Bonacic Kresic, I.; Fogar, M.; Guevara, G.; Simonella, M. 2010. Algodón. Manual de campo. (Ed.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Argentina.
- Bradford, M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-54.
- Bravo, A.; Quintero, R.; Díaz, C.; Martínez, A.; Soberón, M. 1993. Efficiency of insecticidal crystal protein production in a *Bacillus thuringiensis* mutant with derepressed expression of the terminal oxidase aa3 during sporulation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 8: 301-4.
- Bravo, A.; Sarabia, S.; Lopez, L.; Ontiveros, H.; Abarca, C.; Ortiz, A.; Ortiz, M.; Lina, L.; Villalobos, F.; Peña, G.; Nuñez-Valdez, M.; Soberón, M.; Quintero, R. 1998. Characterization of *cry* genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4954-72.
- Bravo, A.; Gómez, I.; Conde, J.; Muñoz-Garay, C.; Sanchez, J.; Miranda, R.; Zhuang, M.; Gill, S.; Soberón, M. 2004. Oligomerization triggers binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochim. Biophys. Acta.* 1667: 38-46.
- Broderick, N.; Raffa, K.; Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 15196-9.

- Broderick, N.; Robinson, C.; McMahon, M.; Holt, J.; Handelsman, J.; Raffa, K. 2009. Contributions of gut bacteria to *Bacillus thuringiensis*-induced mortality vary across a range of Lepidoptera. *BMC biology*. 7: 1.
- Burgerjon, A.; Biache, G.; Cals, P. 1969. Teratology of the Colorado potato beetle, *Leptinotarsa decemlineata*, as provoked by larval administration of the thermostable toxin of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* 14: 274-8.
- Bulla, L.; Bechtel, D.; Kramer, K.; Shetna, Y.; Aronson, A.; Fitz-James, P. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 8: 147-204.
- Cannon, R. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* 71: 561-636.
- Carroll, J.; Convents, D.; Van Damme, J.; Boets, A.; Van Rie, J.; Ellar, D. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* Cry3A  $\delta$ -endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invert. Pathol.* 70: 41-9.
- Cecco, L.; González, H.; Deluchi, P.; Barrios, H.; De Franseschi, M. 2005. Determinación de los estados de desarrollo de *Alphitobius diaperinus*. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 25: 93-9.
- Chakroun, M.; Banyuls, N.; Bel, Y.; Ecriche, B; Ferré, J. 2016. Bacterial Vegetative insecticidal proteins (Vip) from entomopathogenic bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80: 329-50. Erratum in: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2016; 80(3):iii.
- Contreras, E.; Rausell, C.; Real, M. 2013. Proteome response of *Tribolium castaneum* Larvae to *Bacillus thuringiensis* toxin producing strains. *Plos One.* 8(1): e55330.
- Crickmore, N.; Ellar, D. 1992. Involvement of a possible chaperonin in the efficient expression of a cloned *cryIIIA delta-endotoxin gene* in *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-13.
- Crickmore, N.; Baum, J.; Bravo, A.; Lereclus, D.; Narva, K.; Sampson, K.; Schnepf, E.; Sun, M.; Zeigler, D. *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature. <http://www.btnomenclature.info>. 2016.
- da Silva, A; Hoff, G.; Doyle, R.; Santurio, J.; Monteiro, S. 2005. Ciclo biológico do cascudinho *Alphitobius diaperinus* em laboratorio. *Acta. Sci. Vet.* 33: 177-81.
- de Lima, I jr.; Degrande, P.; Miranda, J.; Dos Santos, W. 2013. Evaluation of the boll weevil *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) suppression program in the state of Goiás, Brazil. *Neotrop. Entomol.* 42: 82-8.
- de Maagd, R.; Bravo, A.; Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends Genet.* 17: 193-9.

- de Maagd, R.; Bravo, A.; Berry, C.; Crickmore, N.; Schnepf, H. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-33.
- Dementiev, A.; Board, J.; Sitaram, A.; Hey, T.; Kelker, M.; Xu, X.; Hu, Y.; Vidal-Quist, C.; Chikwana, V.; Griffin, S.; McCaskill, D.; Wang, N.; Hung, S.; Chan, M.; Lee, M.; Hughes, J.; Wegener, A.; Aroian, R.; Narva, K.; BerryMcCaskill, D. 2016. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. *BMC biology.* 14: 71.
- de Oliveira, R.; de Oliveira-Neto, O.; Moura, H.; Macedo, L.; Arraes, F.; Lucena, W.; Lourenço-Tessutti, I.; de Deus Barbosa, A.; da Silva, M.; Grossi-da-da, M. 2016. Transgenic cotton plants expressing Cry1Ia12 toxin confer resistance to fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*) and cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Front. Plant. Sci.* 7: 165.
- de Souza Aguiar, R.; Martins, E.; Ribeiro, B.; Monnerat, R. 2012. Cry10Aa protein is highly toxic to *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), an important insect pest in Brazilian cotton crop fields. *Bt Research.* 3: 20-8.
- Despins, J.; Turner, E. jr.; Ruzsler, P. 1987. Construction profiles of the high rise caged layer houses in association with isolation damage caused by lesser mealworm *Alphitobius diaperinus* (Panzer) in Virginia. *Poult. Sci.* 66: 243-50.
- Donovan, W.; Engleman, J.; Donovan, J.; Baum, J.; Bunkers, G.; Chi, D.; Clinton, W.; English, L.; Heck, G.; Ilagan, O.; Krasomil-Osterfeld, K.; Pitkin, J.; Roberts, J.; Walters, M. 2006. Discovery and characterization of Sip1A: a novel secreted protein from *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran larvae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72: 713-9.
- Dow, J. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.* 19: 187-328.
- Ellis, R.; Stockhoff, B.; Stamp, L.; Schnepf, H.; Schwab, G.; Knuth, M.; Russell, J.; Cardineau, G.; Narva, K. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1137-45.
- Ertola, R. 1987. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. En: Aiba, S. (ed.). *Horizons of biochemical engineering.* P. 187-99.
- Espinasse, S.; Gohar, M.; Chaufaux, J.; Buisson, C.; Perchat, S.; Bourguet, D.; Sanchis, V. 2003. Occurrence and linkage between secreted insecticidal toxins in natural isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 47: 501-7.
- Estruch, J.; Warren, G.; Mullinc, M.; Nye, G.; Craig, J.; Koziel, M. 1996. Vip3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticidal protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 5389-94.

- Fabrick, J.; Oppert, C.; Lorenzen, M.; Morris, K.; Oppert, B.; Jurat-Fuentes, J. 2009. Novel *Tenebrio molitor* Cadherin Is a Functional Receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa Toxin. *J. Biol. Chem.* 284: 18401-10.
- Faloci, M.; Yantorno, O.; Marino, H.; Arcas, J.; Ertola, R 1990. Effect of the media composition on the growth parameters and biological properties of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* delta-endotoxin. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 32-8.
- Fishbein, D. 2012. Introducción a la teoría del control biológico de plagas. En: Villacide, J.; J. Corley (eds.), Serie técnica: "Manejo Integrado de Plagas Forestales", Cuadernillo N° 15: 1-21.
- Fogar, M.; Simonella, M.; Fontana, M.; Guevara, G.; Ibaló, S.; Tcach, M.; Bonasic Kresic, I. Guía Práctica para el manejo y control de picudo en el cultivo de algodón. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (Ed.). <http://inta.gov.ar/documentos/guia-practica-para-el-manejo-y-control-del-picudo-en-el-cultivo-de-algodon>. 2015.
- Francisco, O.; do Prado, A. 2001. Characterization of the larval stages of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) using head capsule width. *Rev. Bras. Biol.* 61: 125-31.
- Galitsky, N.; Cody, V.; Wojtczak, A.; Ghosh, D.; Luft, J.; Pangborn, W.; English, L. 2001. Structure of the insecticidal bacterial delta-endotoxin Cry3Bb1 of *Bacillus thuringiensis*. *Acta Crystallogr. Sect. D.* 57: 1101-9.
- Gazoni, F.; Flores, F.; Bampi, R.; Silveira, F.; Boufleur, R.; Lovato, M. 2012. Avaliação da resistência do cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) a diferentes temperaturas. *Arq. Inst. Biol.* 79: 69-74.
- Geden, C.; Hogsette, J. 1994. Research and extension needs for integrated pest management for arthropods of veterinary importance. *Proceedings of a Workshop in Lincoln, Nebraska.* 56-64
- Geden, C.; Steinkraus, D. 2003. Evaluation of three formulations of *Beauveria bassiana* for control of lesser mealworm and hide beetle in Georgia poultry houses. *J. Econ. Entomol.* 96: 1602-7.
- Glare, T.; O'Callaghan, M. 2000. Appendix 2.1. Invertebrate species reported as susceptible to Bt. En: Glare, T.; O'Callaghan, M. (Ed.). *Bacillus thuringiensis: biology, ecology and safety.* 211-67.
- Goldberg, L.; Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentie*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univitattus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. *Mosq. News.* 37: 355-8.
- Gómez, S.; Díaz, G.; Núñez, V. 2006. Evaluación de la toxicidad de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre el picudo del algodonero *Anthonomus grandis* Boheman. *Agron. Colomb.* 24: 296-301.
- Gómez, G.; Batista, C. 2006. Optimización de medios de cultivos para microorganismos, una valiosa estrategia para la producción de biopreparados de interés agrícola. *Cultivos Tropicales.* 27: 17-24.

- Gonzalez, J.; Dulmage, H.; Carlton, B. 1981. Correlation between specific plasmids and endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. *Plasmid*. 5: 351-65.
- González-Cabrera, J.; Herrero, S.; Ferré, J. 2001. High genetic variability for resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins in a single population of diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5043-8.
- Grossi-de-Sá, M.; Magalhães, M.; Silva, M.; Silva, S.; Dias, S.; Nakasu, E.; Brunetta, P.; Oliveira, G.; Oliveira Neto, O.; Oliveira, R.; Soares, L.; Ayub, M.; Siqueira, H.; Figueira, E. 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. *J. Biochem. Mol. Biol.* 40: 773-82.
- Guinebretière, M.; Auger, S.; Galleron, N.; Contzen, M.; De Sarrau, B.; De Buyser, M.; Lamberet, G.; Fagerlund, A.; Granum, P.; Lereclus, D.; De Vos, P.; Nguyen-The, C.; Sorokin, A. 2013. *Bacillus cytotoxicus* sp. nov. is a novel thermotolerant species of the *Bacillus cereus* group occasionally associated with food poisoning. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 63: 31-40.
- Guo, S.; Ye, S.; Liu, Y.; Wei, L.; Xue, J.; Wu, H.; Song, F.; Zhang, J.; Wu, X.; Huang, D.; Rao, Z. 2009. Crystal structure of *Bacillus thuringiensis* Cry8Ea1: An insecticidal toxin toxic to underground pests, the larvae of *Holotrichia parallela*. *J. Struct. Biol.* 168: 259-66.
- Hajek A. 2004. *Natural Enemies. An introduction to biological control.* Cambridge University Press, New York.
- Haloi, K.; Kalita, M.; Nath, R.; Devi, D. 2016. Characterization and pathogenicity assessment of gut-associated microbes of muga silkworm *Antheraea assamensis* Helfer (Lepidoptera: Saturniidae). *J. Invertebr. Pathol.* 138: 73-85.
- Han, S.; Craig, J.; Putnam, C.; Carrozi, N.; Tainer, J. 1999. Crystal structure of Vegetative Insecticidal Protein2 (VIP2). *Nat. Struc. Biol.* 6: 932-6.
- Herrnstadt, C.; Soares, G.; Wilcox, E.; Edwards, D. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* with activity against coleopteran insects. *Nat. Biotechnol.* 4: 305-8.
- Herrnstadt, C.; Gilroy, T.; Sobieski, D.; Bennett, B.; Gaertner, F. 1987. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a coleopteran-active delta-endotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *san diego*. *Gene.* 57: 37-46.
- Hickle, L.; Bradfisch, G.; Sick, A. 1991. Use of *Bacillus thuringiensis* microbe for controlling lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus*. U.S. Patent No 5.064.648.
- Hickel, L.; Bradfisch, G.; Payne, J. 1991a. Use of a *Bacillus thuringiensis* microbe for controlling lesser meal-worm, *Alphitobius diaperinus*. US Patent No 5100665.

- Höfte, H.; Whiteley, H. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53: 242-55.
- Hosen, M.; Khan, A.; Hossain, M. 2004. Growth and development of the lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) on cereal flours. Pakistan J. Biologic. Sci. 7: 1505-8.
- Hua, G.; Park, Y.; Adang, M. 2014. Cadherin AdCad1 in *Alphitobius diaperinus* larvae is a receptor of Cry3Bb toxin from *Bacillus thuringiensis*. Insect Biochem. Mol. Biol. 45: 11-7.
- Huber, H.; Lüthy, P. 1981. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin: composition and activation. Davidson, E. (ed.). Pathogenesis of invertebrate microbial disease. New Jersey.
- Ibarra, J.; Del Rincón, M.; Orduz, S.; Noriega, D.; Benintende, G.; Monnerat, R.; Regis, L.; De Oliveira, C.; Lanz, H.; Rodriguez, M.; Sanchez, J.; Peña, G.; Bravo, A. 2003. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. Appl. Environ. Microbiol. 69: 5269-74.
- Iriarte, J.; Caballero, P. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. En: Caballero, P.; Ferré, J. (ed.). Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. P. 15-44.
- Jara, S.; Maduell, P.; Orduz, S. 2006. Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains in the maize and bean phylloplane and their respective soils in Colombia. J. Appl. Microbiol. 101: 117-24.
- Jiménez, G.; Urdiain, M.; Cifuentes, A.; López-López, A.; Blanch, A.; Tamames, J.; Kämpfer, P.; Kolstø, A.; Ramón, D.; Martínez, J.; Codoñer, F.; Rosselló-Móra, R. 2013. Description of *Bacillus toyonensis* sp. nov., a novel species of the *Bacillus cereus* group, and pairwise genome comparisons of the species of the group by means of ANI calculations. Syst. Appl. Microbiol. 36: 383-91.
- Johnson, D.; Mcgaughey, W. 1996. Contribution of *Bacillus thuringiensis* spores to toxicity of purified Cry proteins towards Indian meal moth larvae. Curr. Microbiol. 33: 54-9.
- Johnson, D.; Oppert, B.; McGaughey, W. 1998. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the Indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). Curr. Microbiol. 36: 278-82.
- Jung, M.; Paek, W.; Park, I.; Han, J.; Sin, Y.; Paek, J.; Rhee, M.; Kim, H.; Song, H.; Chang, Y. 2010. *Bacillus gaemokensis* sp. nov., isolated from foreshore tidal flat sediment from the Yellow Sea. J. Microbiol. 48: 867-71.
- Jung, M.; Kim, J.; Paek, W.; Lim, J.; Lee, H.; Kim, P.; Ma, J.; Kim, W.; Chang, Y. 2011. *Bacillus manliponensis* sp. nov., a new member of the *Bacillus cereus* group isolated from foreshore tidal flat sediment. J. Microbiol. 49: 1027-32.

- Kelker, M.; Berry, C.; Evans, S.; Pai, R.; McCaskill, D.; Wang, N.; Russell, J.; Baker, M.; Yang, C.; Pflugrath, J.; Wade, M.; Wess, T.; Narva, K. 2014. Structural and biophysical characterization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins Cry34Ab1 and Cry35Ab1. *PLoS One*. 12;9(11):e112555.
- Khetan, S. 2001. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan (ed.). *Microbial Pest*. P. 14.
- Kostichka, K.; Warren, G.; Mullins, M.; Mullins, A.; Craig, J.; Koziel, M.; Estruch, J. 1996. Cloning of *cryV*-type insecticidal protein gene form *Bacillus thuringiensis*: the *cryV*-encoded protein is expressed early in stationary phase. *J. Bacteriol.* 178: 2141-4.
- Koller, C.; Bauer, L.; Hollingworth, R. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego*  $\delta$ -endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184: 692-9.
- Krieg, V.; Huger, A.; Langenbruch, G.; Snetter, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: a new pathotype effective against larvae of Coleoptera. *J. Appl. Entomol.* 96: 500-8.
- Krieg, V.; Huger, A.; Snetter, W. 1987. "*Bacillus thuringiensis* var. *san diego*" Stamm M-7 ist identisch mit dem zuvor in Deutschland isolierten käferwirnsamen *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis* Stamm BI 256-82. *J. Appl. Entomol.* 104: 417-24.
- Kurt, A.; Özkan, M.; Özcengiz, G. 2005. Inorganic phosphate has a crucial effect on Cry3Aa  $\delta$ -endotoxin production. *Lett. Appl. Microbiol.* 41: 303-8.
- Lecuona, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plaga. En: Lecuona, R. (Ed.). *Talleres Gráficos Mariano Mas, Buenos Aires*.
- Levinson, B.; Kasyan, K.; Chiu, S.; Currier, T.; González, J. 1990. Identification of  $\beta$ -exotoxin production, plasmids encoding  $\beta$ -exotoxin, and a new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high-performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.* 172: 3172-9.
- Li, H.; Liu, R.; Shu, C.; Zhang, Q.; Zhao, S.; Shao, G.; Zhang, X.; Gao, J. 2014. Characterization of one novel *cry8* gene from *Bacillus thuringiensis* strain Q52-7. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30: 3075-80.
- Li, J.; Carroll, J.; Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature*. 353: 815-21.
- Linser, P.; Dinglasan, R. 2014. Insect gut structure, function, development and target of biological toxins. En: Dhadialla, T.; Gill, S. (ed.) *Advanced in insect physiology. Insect midgut and insecticidal proteins*. 47: 1-37.
- Liu, B.; Liu, G.; Hu, G.; Cetin, S.; Lin, N.; Tang, J.; Tnag, W.; Lin, Y. Z. 2014. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie van Leeuwenhoek*. 105: 501-10.

- Liu, X.; Ruan, L.; Hu, Z.; Peng, D.; Cao, S.; Yu, Z.; Liu, Y.; Zheng, J.; Sun, M. 2010. Genome-wide screening reveals the genetic determinants of an antibiotic insecticide in *Bacillus thuringiensis*. *J. Biol. Chem.* 285: 39191-200.
- Liu, Y.; Tabashnik, B.; Moar, W. ; Smith, R. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1385-9.
- López-Meza, J.; Ibarra, J. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1306-10.
- López-Pazos, S.; Cerón, J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA.* 8: 183-94.
- Loseva, O.; Ibrahim, M.; Candas, M.; Koller, C.; Bauer, L.; Bulla Jr., L. 2002. Changes in protease activity and Cry3Aa toxin binding in the Colorado potato beetle: implications for insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32: 567-77.
- Maduell, P.; Callejas, R.; Cabrera, K.; Armengol, G.; Orduz, S. 2002. Distribution and characterization of *Bacillus thuringiensis* on the phylloplane of Piper (Piperaceae) in three altitudinal levels. *Microbiol. Environ. Microbiol.* 55: 2437-42.
- Magasanik, B.; Neidhardt, F. 1987. Regulation of carbon and nitrogen utilization in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology. En: Neidhardt, F.; Ingraham, J.; Low, K.; Magasanik, B.; Schaechter, M.; Umberger, H. (Ed.). American Society for Microbiology. P. 1318-25.
- Martin, M.; Martin, J. 1984. Surfactants: their role in preventing the precipitation of proteins by tannins in insect guts. *Occologia.* 61: 342-6.
- Martínez, C.; Pacheco, M.; Hernández, J. 2002. Manejo integrado de plagas del algodón en el sur de Sonora. INIFAP-CIRNO. Campo Experimental Valle del Yaqui. Folleto Técnico Núm. 46. Sonora, México. P. 70.
- Martins, E.; Praça, L.; Dumas, V.; Silva-Werneck, J.; Sone, E.; Waga, I.; Berry, C.; Monnerat, R. 2007. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). *Biol. Control.* 40: 65-8.
- Martins, E.; Aguiar, R.; Martins, N.; Melatti, V.; Falcão, R.; Gomes, A.; Ribeiro, B.; Monnerat, R. 2008. Recombinant Cry1Ia protein is highly toxic to cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman) and fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*). *J. Appl. Entomol.* 104: 1363-71.
- Martins, E.; Monnerat, R.; Queiroz, P.; Duma, V.; Braz, S.; Aguiar, R.; Gomes, A.; Sánchez, J.; Bravo, A.; Ribeiro, B. 2010. Midgut GPI-anchored proteins with alkaline phosphatase activity from the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*) are putative receptors for the Cry1B protein of *Bacillus thuringiensis*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 40: 138-45.

- McAllister, J.; Steelman, C.; Skeeles, K.; Newberry, L.; Gbur, E. 1996. Reservoir competence of *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera Tenebrionidae) for *Escherichia coli* (Eubacteriales: Enterobacteriaceae). *J. Med. Entomol.* 3: 983-7.
- Mendez-Lopez, I.; Basurto-Rios, R.; Ibarra, J. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). *FEMS Microbiol. Letts.* 226: 73-7.
- Miller, R.; Beno, S.; Kent, D. ; Carroll, L.; Martin, N.; Boor, K.; Kovac, J. 2016. *Bacillus wiedmannii* sp. nov. is a new psychrotolerant and cytotoxic *Bacillus cereus* group species isolated from dairy foods and environments in the USA. *Int. J. Sys. Evol. Microbiol.* EN PRENSA.
- MinAgri. Sistema integrado de información agropecuaria. <http://www.siiia.gov.ar>. 2016.
- Moar, W.; Osbrink, W.; Trumble, J. 1986. Potentiation of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* with thuringiensin on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 79: 1443-6.
- Monella, R.; Sauka, D.; Benintende, G. 2007. Evaluación de nuevas formulaciones biológicas para el control de *Aedes aegypti*. En Actas X SICONBIOL, Brasilia DF, Brasil.
- Monnerat, R.; Martins, E.; Queiroz, P.; Ordúz, S.; Jaramillo, G.; Benintende, G.; Cozzi, J.; Real, M.; Martinez-Ramirez, A.; Rausell, C.; Cerón, J.; Ibarra, J.; Del Rincon-Castro, M.; Espinoza, A.; Meza-Basso, L.; Cabrera, L.; Sánchez, J.; Soberon, M.; Bravo, A. 2006. Genetic variability of *Spodoptera frugiperda* Smith (Lepidoptera: Noctuidae) populations from Latin America is associated with variations in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* cry toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 7029-35.
- Monnerat, R.; Martins, E.; Praça, L.; Dumas, V.; Berry, C. 2012. Activity of a Brazilian strain of *Bacillus thuringiensis israelensis*, against the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis* Boheman, 1843) (Coleoptera: Tenebrionidae). *Neotrop. Entomol.* 41: 62-7.
- Murdock, L.; Brookhart, G.; Dunn, P.; Foard, D.; Kelley, S.; Kitch, L.; Shade, R; Shukle, R.; Wolfson, J. 1987. Cystein digestive proteinase in Coleoptera. *Comp. Biochem. Pysiol.* 87B: 783-7.
- Navas, L.; Berretta, M.; Pérez, M.; Amadio, A.; Ortiz, E.; Sauka, D.; Benintende, G.; Zandomeni, R. 2014. Sequence and expression of two *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4, a native strain from Argentina. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 24: 241-8.
- Navas, L.; Amadio, A.; Ortiz, E.; Sauka, D.; Benintende, G.; Zandomeni, R.; Berretta, M. 2016. Complete sequence and organization of pFR260, the *Bacillus thuringiensis* INTA Fr7-4 plasmid harbouring the insecticidal genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* EN PRENSA.
- Norato, F. 2005. El algodónero manejo integrado del cultivo en Colombia. Programa de transferencia de tecnología. Centro de Investigación Nataima. El Espinal. 6 v. Tolima. Colombia.

- Nussenbaum, A. 2014. Aislamientos de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentos para el control del picudo del algodón, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae). Tesis doctoral. UBA.
- O'Brien, G.; O'Brien, A. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* berliner var. *kurstaki* to reduce the occurrence of darkling beetles in poultry houses. US Patent No 5244660.
- O'Connor, J. 1987. *Alphitobius diaperinus* (Panzer), (Col. Tenebrionidae) damaging polystyrene isolation in an Irish piggy. Entomol. Mon. Mag., 123. 50: 1472-5.
- Ochoa-Campuzano, C.; Real, M.; Martínez-Ramírez, A.; Bravo, A.; Rausell, C. 2007. An ADAM metalloprotease is a Cry3Aa *Bacillus thuringiensis* toxin receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 362: 437-42.
- Oliveira, G.; Silva, M.; Lucena, W.; Nakasu, E.; Firmino, A.; Beneventi, M. 2011. Improving Cry8Ka toxin activity towards the cotton boll weevil (*Anthonomus grandis*). BMC Biotechnol. 9: 11-85.
- Onco, M. 2012. Distribución de genes *vip1* y *vip2* codificantes de proteínas tóxicas para coleópteros en *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad CAECE.
- 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.
- Oppert, B.; Morgan, T.; Hartzler, K.; Lenarcic, B.; Galesa, K.; Brzin, J.; Turk, V.; Yoza, K.; Ohtsubo, K.; Kramer, K. 2003. Effects of proteinase inhibitors on digestive proteinases and growth of the red flour beetle, *Tribolium castaneum* (Herbst) (Coleoptera: Tenebrionidae). Comp. Biochem. Phys. C. 134: 481-90.
- Palma, L.; Muñoz, D.; Berry, C.; Murillo, J.; Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An Overview of Their Biocidal Activity. Toxins. 6: 3296-325.
- Park, Y.; Hua, G.; Taylor, M.; Adang, M. 2014. A coleopteran cadherin fragment synergizes toxicity of *Bacillus thuringiensis* toxins Cry3Aa, Cry3Bb, and Cry8Ca against lesser mealworm, *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). J. Invertebr. Pathol. 123: 1-5.
- Pardo-López, L.; Soberón, M.; Bravo, A. 2013. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. FEMS Microbiol. Rev. 37: 3-22.
- Pigott, C.; Ellar, D. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71: 255-81.
- Plackett, R.; Burman, J. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. Biometrika, 33: 305-25.
- Porcar, M.; Juárez-Pérez, V. 2003. PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. FEMS Microbiol. Rev. 26: 419-32.
- Quesada-Moraga, E.; Garcia-Tovar, E.; Valverde-Garcia, P.; Santiago-Alvarez, C. 2004. Isolation, geographical diversity and insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* from soil in Spain. Microbiol. Res. 159: 59-71.

- Ramalho, F.; Wanderley, P. 1996. Ecology and management of boll weevil in south American cotton. *Am. Entomol.* 42: 41-7.
- Rausell, C.; Pardo-López, L.; Sánchez, J.; Muñoz-Garay, C.; Morera, C.; Soberón, M.; Bravo, A. 2004. Unfolding events in the water-soluble monomeric Cry1Ab toxin during transition to oligomeric pre-pore and membrane-inserted pore channel. *J. Biol. Chem.* 279: 55168-75.
- Reyes-Ramírez, A.; Ibarra, J. 2005. Fingerprinting of *Bacillus thuringiensis* type strains and isolates by using *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1346-55.
- Rodríguez, D.; Merino, A.; Larramendy, R.; Xúarez, M.; Márquez, M.; Temprana, M.; Rebollar, R. 2011. Evaluación de la cepa de *Bacillus thuringiensis* Ibt-25 frente al coleóptero *Alphitobius diaperinus* hospedero intermediario de helmintos parásitos de la gallina doméstica en condiciones de laboratorio. *Rev. Cub. Cienc. Avíc.* 35: 19-23.
- Rodríguez, M.; Martínez, R.; Delgado, M. 2014. Picudo del algodnero y prácticas de manejo integrado. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (Ed.). P. 6-13.
- Roh, J.; Choi, J.; Li, M.; Jin, B.; Je, Y. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 547-59.
- Rosas-García, N. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 10: 49-63.
- Rosell, G.; Quero, C.; Coll, J.; Guerrero A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *J. Pestic. Sci.* 33: 103-21.
- Rydell, T.; Sivasupramanian, S.; Williams, J.; Brown, G.; Fu, X.; Sturman, E.; Roberts, J.; Guzov, V.; Seale, J.; Moshiri, F.; Zheng, M.; Halls, C.; Evdokimov, A. 2001. Crystal structure of Cry23Aa1 and Cry37Aa1 binary protein complex. RSCB PDB.
- Salin, C.; Delettre, Y.; Vernon, P. 2003. Controlling the mealworm *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) in broiler and turkey houses: Field trials with combined insecticide treatment: Insect growth regulator and pyrethroid. *J. Econom. Entomol.* 96: 126-30.
- Sallet, L. 2013. Selección de estirpes de *Bacillus thuringiensis* para o controle de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae). Tesis Doctoral. Universidad de Brasilia.
- Sallet, L.; Araujo, M.; Monnerat, R. 2013. Settlement *Alphitobius diaperinus* Panzer, 1779 (Coleoptera: Tenebrionidae) on different diets in the laboratory. *Biosci. Methods.* 4: 34-9.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchis, V. 2011. From microbial sprays to insect-resistant transgenic plants: History of the biopesticide *Bacillus thuringiensis*. *Agron. Sustain Dev.* 31: 217-31.
- Sattar, S.; Maiti, M. 2011. Molecular characterization of a novel vegetative insecticidal protein from *Bacillus thuringiensis* effective against sap-sucking insect pest. *J. Microbiol. Biotechnol.* 21: 937-46.

- Sauka, D. 2007. Estudio de genes y proteínas insecticidas de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*. Aportes al conocimiento de su distribución y toxicidad en plagas agrícolas. Tesis doctoral. UBA.
- Sauka, D.; Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of Lepidopteran insects behaving as agricultural pest. Rev. Arg. Microbiol. 40: 124-40.
- Sauka, D.; Basurto-Ríos, R.; Ibarra, J.; Benintende, G. 2010. "Characterization of an Argentine isolate of *Bacillus thuringiensis* similar to the HD-1 strain". Neotr. Entomol. 39: 767-73.
- Sauka, D.; Monella, R.; Benintende, G. 2010a. Induced-feeding bioassays for detection of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity against *Epilachna paenulata* (Coleoptera). Pesq. Agrop. Bras. 45: 430-2.
- Sauka, D.; Basile, J.; Benintende, G. 2011. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intraserovar diversity revealed by *Bacillus cereus* group-specific repetitive extragenic palindromic sequence-based PCR genomic fingerprinting. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 21: 184-90.
- Sauka, D.; Rodriguez, S.; Benintende, G. 2012. New variants of lepidopterical toxin genes encoding *Bacillus thuringiensis* Vip3Aa proteins. J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 22: 373-80.
- Sauka, D.; Monella, R.; Benintende, G. 2013. *Bacillus thuringiensis* y su utilidad en el control de insectos plaga asociados a la rizosfera. Rizosfera, Biodiversidad y Agricultura Sustentable. García de Salamone, I.; Cassan, F. (Ed.). Asociación Argentina de Microbiología. P. 89-107.
- Sauka, D.; Pérez, M.; López, N.; Onco, M.; Berretta, M.; Benintende, G. 2014. PCR-based prediction of type I  $\beta$ -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. J. Invertebr. Pathol. 122: 28-31.
- Sayed, A.; Nekl, E.; Siqueira, H.; Wang, H.; Ffrench-Constant, R.; Bagley, M.; Siegfried, B. 2007. A novel cadherin-like gene from western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* (Coleoptera: Chrysomelidae), larval midgut tissue. Insect Mol. Biol. 16: 591-600.
- Schneider-Orelli, O. 1947. Entomologisches Praktikum, 2nd.ed. Aarau, Sauerlander.
- Schnepf, H.; Lee, S.; Dojillo, J.; Burmeister, P.; Fencil, K.; Morera, L.; Nygaard, L.; Narva, K.; Wolt, J. 2005. Characterization of Cry34/Cry35 binary insecticidal proteins from diverse *Bacillus thuringiensis* strain collections. Appl. Environ. Microbiol. 71: 1765-74.
- Schroeckenstein, D.; Meier-Davis, S.; Graziano, F.; Bush, R. 1989. Occupational sensitivity to *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (lesser mealworm). J. Allergy Clin. Immunol. Pract. 82: 1081-8.
- Sebesta, K.; Horska, K. 1970. Mechanism of inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Biochim. Biophys. Acta, Nucleic Acids Protein Synth. 209: 357-67.
- Segabinazi, S.; Flores, M.; Barcelos, A.; Jacobsen, G.; Eltz, R. 2005. Bactérias da família Enterobacteriaceae em *Alphitobius diaperinus* oriundos de granjas avícolas dos Estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina, Brasil. Acta. Sci. Vet. 33: 51-5.

- Sekar, V.; Thompson, D.; Maroney, M.; Bookland, R.; Adang, M. 1987. Molecular cloning and characterization of the insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 7036-40.
- Sharifi, M.; Gholamzadeh Chitgar, M.; Ghadamyari, M.; Ajamhasani, M. 2012. Identification and characterization of midgut digestive proteases from the rosaceous branch borer, *Osphranteria coerulescens* redtenbacher (coleoptera: cerambycidae). Rom. J. Biochem. 49: 33-47.
- Shu, C.; Yu, H.; Wang, R.; Fen, S.; Su, X.; Huang, D.; Zhang, J.; Song, F. 2009. Characterization of two novel *cry8* genes from *Bacillus thuringiensis* strain BT185. Curr. Microbiol. 58: 389-92.
- Silva, C.; Monnerat, R.; Lima, L.; Martins, E.; Filho, P.; Pinheiro, P.; Santos, R. 2015. Stable integration and expression of a *cry11a* gene conferring resistance to fall armyworm and boll weevil in cotton plants. Pest. Manag. Sci. 72: 1549-57.
- Sims, S. 1995. *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* [CryIA(c)] protein expression in transgenic cotton: effects on beneficial and other non-target insects. Southwest. Entomol. 20: 493-500.
- Song, P.; Wang, Q.; Nangong, Z.; Su, J.; Ge, D. 2012. Identification of *Henosepilachna vigintioctomaculata* (Coleoptera: Coccinellidae) midgut putative receptor for *Bacillus thuringiensis* insecticidal Cry7Ab3 toxin. J. Invertebr. Pathol. 109: 318-22.
- Srinivasa Rao, K.; Pattanayak, D.; Sreevathsa, R. 2016. By Insecticidal Crystal Protein: Role in Insect Management and Crop Improvement. En: Sree, K. Sowjanya, Varma, Ajit (Ed.). Biocontrol of Lepidopteran Pests. Use of Soil Microbes and their Metabolites. P. 55.
- Tabashnik, B.; Brévault, T.; Carrière, Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat. Biotechnol. 32: 510-21.
- Terra, W.; Ferreira, C. 1994. Insect digestive enzymes: properties, compartmentalization and function. Comp. Biochem. Physiol. 109B: 1-62.
- Tounsi, S.; J'Mal, A.; Zouari, N.; Jaoua, S. 1999. Cloning and nucleotide sequence of a novel *cry1Aa*-type gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*. Biotechnol. Lett. 21: 771-5.
- Tsuchiya, S.; Kasaishi, Y.; Harada, H.; Ichimatsu, T.; Saitoh, H.; Mizuki, E.; Ohba, M. 2002. Assessment of the efficacy of Japanese *Bacillus thuringiensis* isolates against the cigarette beetle, *Lasioderma serricorne* (Coleoptera: Anobiidae). J. Invertebr. Pathol. 81: 122-6.
- United States Environmental Protection Agency. www.epa.gov. 2016.
- Upadhyay, S.; Singh, P. 2011. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. Biotechnol. Lett. 33: 2027-36.
- Uribe, D.; Martinez, W.; Cerón, J. 2003. Distribution and diversity of *cry* genes in native strains of *Bacillus thuringiensis* obtain from different ecosystems from Colombia. J. Invertebr. Pathol. 82: 119-27.
- van Frankenhuyzen, K.; Liu, Y.; Tonon, A. 2010. Interactions between *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and midgut bacteria in larvae of gypsy moth and spruce budworm. J. Invertebr. Pathol. 103: 124-31.

- Xu, C.; Wang, B.; Yu, Z.; Sun, M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins*. 6: 2732-70.
- Xu, C.; Chinte, U.; Chen, L.; Yao, Q.; Meng, Y.; Zhou, D.; Bi, L.; Rose, J.; Adang, M.; Wang, B.; Yu, Z.; Sun M. 2015. Crystal structure of Cry51Aa1: A potential novel insecticidal aerolysin-type  $\beta$ -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462: 184-9.
- Xu, D.; Côté, J. 2006. Sequence diversity of the *Bacillus thuringiensis* and *B. cereus* sensu lato flagellin (H antigen) protein: comparison with H serotype diversity. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4653-62.
- Yamaguchi, T.; Bando, H.; Asano, S. 2013. Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry8Da toxin-binding glucosidase from the adult Japanese beetle, *Popillia japonica*. *J. Invertebr. Pathol.* 113: 123-8.
- Yang, X.; Wmag, S. 1998. Development of *Bacillus thuringiensis* fermentation and process control from a practical perspective. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 29: 95-8.
- Yokoyama, T.; Tanaka, M.; Hasegawa, M. 2004. Novel cry gene from *Paenibacillus lentimorbus* strain Semadara inhibits ingestion and promotes insecticidal activity in *Anomala cuprea* larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 85: 25-32.
- Zhang, J.; Hodgman, T.; Krieger, L.; Schnetter, W.; Schairer, H. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. *J. Bacteriol.* 179: 4336-41.
- Zhang, X.; Candas, M.; Griko, N.; Taussig, R.; Bulla, L. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 9897-902.
- Zhu, L.; Peng, D.; Wang, Y.; Ye, W.; Zheng, J.; Zhao, C.; Han, D.; Geng, C.; Ruan, L.; He, J.; Yu, Z.; Sun, M. 2015. Genomic and transcriptomic insights into the efficient entomopathogenicity of *Bacillus thuringiensis*. *Sci. Rep.* 5: 14129.
- Zúñiga-Navarrete, F.; Gómez, I.; Peña, G.; Bravo, A.; Soberón, M. 2013. A *Tenebrio molitor* GPI-anchored alkaline phosphatase is involved in binding of *Bacillus thuringiensis* Cry3Aa to brush border membrane vesicles. *Peptides*. 41: 81-6.



# *Abreviaturas*



## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ADNp</b>	ADN plasmídico
<b>ALP</b>	Fosfatasa alcalina
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ANOVA</b>	Análisis de varianza
<b>APN</b>	Aminopeptidasa N
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
$\beta_i$	Coefficiente teórico
<b>B</b>	Cristal bipiramidal
<b>BGSC</b>	Bacillus Genetic Stock Center - EE.UU
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>Bt</b>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
<b>C</b>	Coleoptera
<b>Cu</b>	Cristal cúbico
<b>ca.</b>	Circa
<b>CA</b>	Cristal cuadrado aplanado
<b>CAD</b>	Caderina
<b>CC</b>	Cultivo completo
<b>CINVESTAV</b>	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional - México
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentración letal media
<b>c.s.p</b>	Cantidad suficiente para
<b>d</b>	Día (s)
<b>D</b>	Diptera
<b>DCC</b>	Diseño Central Compuesto
<b>DE</b>	Desvío estándar
<b>dNTP</b>	Desoxi-nucleótido(s) tri-fosfato(s)
<b>DO</b>	Densidad Óptica
<b>E</b>	Efecto estandarizado o estadístico t

<b>EDTA</b>	EthyleneDiamine Tetraacetic Acid
<b>Fig.</b>	Figura
<b>g</b>	Gramo (s)
<b>GPI</b>	Glicosilfosfatidilinositol
<b>h</b>	Hora (s)
<b>ha</b>	Hectareas
<b>IP</b>	Institut Pasteur-Francia
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>l</b>	Litro (s)
<b>L</b>	Lepidoptera
<b>M</b>	Molar
<b>min</b>	Minuto (s)
<b>ml</b>	Mililitro (s)
<b>mm</b>	Milimetro (s)
<b>mM</b>	Milimolar
<b>N</b>	Normal
<b>Ne</b>	Nematoda
<b>ND</b>	No determinado
<b>nm</b>	Nanómetro (s)
<b>ORFs</b>	Open Reading frame
<b>P</b>	<i>Pellet</i> (s)
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PM</b>	Peso molecular
<b>PS</b>	<i>Pellet</i> solubilizado
<b>PST</b>	<i>Pellet</i> solubilizado tripsinizado
<b>REP</b>	Repetitive Extragenic Palindromic Sequence
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>s</b>	Segundo (s)
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulphate

## Abreviaturas

<b>SDS-PAGE</b>	Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis
<b>SF</b>	Sobrenadante filtrado
<b>SFA</b>	Sobrenadante filtrado autoclavado
<b>Sip</b>	Secreted insecticidal protein
<b>svar.</b>	Serovar
<b>TAE</b>	Tris Acetato EDTA
<b>TBE</b>	Tris Borato EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametil-diamina
<b>V</b>	Voltios
<b>Vip</b>	Vegatitive insecticidal protein
<b>USDA</b>	United States Department of Agriculture - EE.UU
<b>UFC</b>	Unidades Formadoras de Colonias
<b>μl</b>	Microlitro (s)
<b>μg</b>	Microgramo (s)
<b>°C</b>	Grados Celsius