

Título: Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica.

*Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires,
Área Ciencias Agropecuarias*

María Inés Onco

Licenciada en Ciencias Biológicas - Universidad CAECE - 2012

Lugar de trabajo: Laboratorio de Insumos Bacterianos. Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
Castelar, Buenos Aires, ARGENTINA.



FAUBA

Escuela para Graduados Ing. Agr. Alberto Soriano
Facultad de Agronomía – Universidad de Buenos Aires



COMITÉ CONSEJERO

DIRECTOR DE TESIS

Diego Herman Sauka

Bioq. (Universidad de Buenos Aires)

Dr. (Universidad de Buenos Aires)

CO-DIRECTOR

Graciela Beatriz Benintende

Ing. Agr. (Universidad Nacional de Entre Ríos)

JURADO DE TESIS

JURADO

María Alejandra Bravo de la Parra

B.S. (Universidad Nacional Autónoma de México)

Dr. en Investigación Biomédica Básica (Universidad Nacional Autónoma de México)

JURADO

Marcela Inés Schneider

Ing. Agr. (Universidad Nacional de Cuyo)

Dr. en Ingeniería Agronómica (Universidad Politécnica de Madrid)

JURADO

Olga Susana Correa

Ing. Agr. (Universidad de Buenos Aires)

M.S. en Producción Vegetal (Universidad de Buenos Aires)

Fecha de defensa de la tesis: 26 de Junio de 2018

Agradecimientos

A Dios por brindarme salud.

A mi director, el Dr. Diego Sauka por brindarme sus conocimientos, por guiarme, por su incondicional asesoramiento, ayuda, predisposición y preocupación y por el gran aporte brindado en la elaboración y dirección de este trabajo, gran profesional y persona.

A mi co-directora, la Ing. Agr. Graciela Benintende por su valiosa colaboración, predisposición y asesoramiento, por brindarme sus conocimientos y experiencia, otra gran profesional y persona.

A mis compañeros del laboratorio, Dres. Marcelo Berretta, Laura Navas, Maximiliano Ortiz y Melisa Perez, Lic. Analía Pedarros, Aux. Téc. Irma Fuxan, Carmen Mercado, Nanci López y Maximiliano Torres, a todos mi agradecimiento por la buena predisposición para ofrecer colaboración.

*A la Ing. Agr. Graciela Quintana, a Lorena Ruiz Díaz y a Marcelo Farinon, por brindarme los ejemplares de *Cydia pomonella*.*

A la Dra. Silvia Lopez, Ing. Agr. Graciela Quintana, Dr. Joel Arneodo y Dra. Viviana Barrera, por su colaboración y por sus consejos.

A la Escuela para Graduados Alberto Soriano, y la gente que la conforma, por permitirme la realización del Doctorado, por responder siempre a mis dudas y por la formación académica que me brindó.

Al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola del INTA por brindarme el espacio y los fondos para realizar este estudio.

Al CONICET, por otorgarme la beca para poder realizar la tesis.

A mis padres que estuvieron alentándome con sus consejos para que siga el camino correcto durante todo el transcurso de mi vida y carrera.

A mis hermanos por su amor y apoyo.

A mis amigos, por su preocupación y sus palabras de aliento.

Y a todas las personas que participaron y colaboraron de cualquier manera para poder lograr la culminación del trabajo.

Declaración

Declaro que el material incluido en esta tesis es, a mi mejor saber y entender, original producto de mi propio trabajo (salvo en la medida en que se identifique explícitamente las contribuciones de otros), y que este material no lo he presentado, en forma parcial o total, como una tesis en ésta u otra institución.

María Inés Onco

INDICE GENERAL

Abreviaturas.....	xiv
Resumen.....	xvi
Abstract.....	xvii
Capítulo 1: Introducción	1
1. Mapa de situación y antecedentes.....	2
2. <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
2.1. Generalidades del entomopatógeno.....	3
2.2. Marco histórico.....	4
2.3. Taxonomía actual.....	5
2.4. Ciclo de desarrollo.....	5
2.5. Ecología y hábitat.....	5
2.6. Cristales paraesporales.....	6
2.7. Espectro de acción.....	7
2.8. Factores de virulencia.....	7
2.8.1. Proteínas Cry.....	7
2.8.2. Otros factores de virulencia.....	8
2.8.3. Estructura de las proteínas Cry.....	9
2.9. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.....	10
2.10. Material genético.....	12
2.11. Genes <i>cry</i> codificantes de proteínas tóxicas para lepidópteros.....	13
2.12. Bioinsecticidas y plantas Bt para el manejo de lepidópteros plaga.....	14
3. <i>Cydia pomonella</i> : plaga principal de frutales de pepita.....	15
3.1 <i>Cydia pomonella</i>	15
3.2 Biología y comportamiento.....	16
Objetivos e Hipótesis.....	19
Objetivo general.....	20
Objetivos específicos.....	20

Hipótesis general	21
Hipótesis específicas	21
Capítulo 2: Materiales y Métodos	22
1. Cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> empleadas.....	23
2. Preparación de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas en diversos ensayos.....	25
3. Ensayos biológicos de toxicidad.....	26
3.1. Bioensayos de <i>Bacillus thuringiensis</i> con <i>Cydia pomonella</i>	26
3.1.1. Bioensayos “burdos” con <i>Cydia pomonella</i>	26
3.1.2. Bioensayos “finos” con <i>Cydia pomonella</i>	27
3.2. Bioensayos “burdos” con <i>Alphitobius diaperinus</i>	27
3.3. Bioensayos “burdos” con <i>Aedes aegypti</i>	28
4. Detección y caracterización morfológica de los cristales.....	28
5. Materiales y metodologías para el análisis de proteínas.....	28
5.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.....	28
5.2. Solubilización y tripsinización de cristales.....	29
5.3. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).....	29
6. Materiales y metodologías para el análisis de ácidos nucleicos.....	30
6.1. Extracción de DNA total de <i>Bacillus thuringiensis</i>	30
6.1.1. Método de hervor simple.....	30
6.1.2. Método de extracción por kit comercial.....	30
6.2. Extracción de DNA plasmídico.....	31
6.3. Amplificación génica mediante PCR (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)...	32
6.3.1. Mezcla de reacciones.....	32
6.3.2. Parámetros de las reacciones.....	32
6.3.3. Cebadores.....	33
6.4. Electroforesis en geles de agarosa.....	35
6.5. Análisis filogenético de los resultados obtenidos mediante Rep-PCR.	35
7. Clonado y expresión de proteínas Cry individuales de <i>B. thuringiensis</i>	35
7.1. Clonado y expresión de genes <i>cry</i>	36

7.2.	Preparación de células electrocompetentes.....	38
7.2.1.	Preparación de células electrocompetentes de <i>Escherichia coli</i>	38
7.2.2.	Preparación de células electrocompetentes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	39
7.3.	Minipreparación de DNA plasmídico.....	39
7.4.	Secuenciación parcial de clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> y genes 16S rDNA.....	40
8.	Aislamiento y conservación de nuevos <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
8.1.	Aislamiento de <i>Bacillus thuringiensis</i>	40
8.2.	Conservación de los aislamientos.....	41
8.2.1.	Conservación de la suspensión espora-cristal a -20 °C.....	41
8.2.2.	Conservación en tiras de papel.....	41
9.	Materiales y metodologías para el análisis exploratorio de las variables que influyen en la producción de proteínas insecticidas.....	41
9.1.	Preparación del inóculo.....	41
9.2.	Caldos de cultivo empleados.....	42
9.3.	Diseño experimental para el análisis de variables del medio de cultivo que influyen en la producción de proteínas insecticidas.....	42
9.4.	Parámetros de medición.....	43
	Capítulo 3: Resultados y Discusión.....	45
	<u>Sección 1:</u> Clonado y expresión de factores de virulencia activos de <i>Bacillus thuringiensis</i> y análisis de la toxicidad de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> para larvas de Carpocapsa (<i>Cydia pomonella</i> L.).....	46
1.1.	Clonado y expresión individual de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i>	46
1.2.	Toxicidad de proteínas Cry de <i>Bacillus thuringiensis</i> para larvas de <i>Cydia pomonella</i>	56
1.2.1.	Toxicidad de proteínas Cry individuales para <i>Cydia pomonella</i>	57
1.2.2.	Toxicidad de mezclas de proteínas Cry individuales para <i>Cydia pomonella</i> y análisis de la interacciones entre ellas.....	59
	<u>Sección 2:</u> Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de <i>Bacillus thuringiensis</i> a partir de larvas vivas y sanas de Carpocapsa.....	62
2.1.	Aislamiento, identificación y caracterización preliminar de nuevos <i>Bacillus thuringiensis</i>	63
2.1.1.	Detección de genes de toxinas insecticidas Cry y Vip mediante amplificación génica.	66
2.1.2.	Detección de genes que codifican otros metabolitos insecticidas o mejoradores de la actividad insecticida.....	68
2.2.	Análisis de aislamientos nativos de <i>Bacillus thuringiensis</i> mediante Rep-PCR.....	69

2.3.	Análisis filogenético.....	71
2.4.	Evaluación de la actividad tóxica de los aislamientos nativos obtenidos para larvas de distintos órdenes de insectos.....	72
Sección 3: Selección de una cepa con alta actividad hacia larvas de <i>Cydia pomonella</i> y análisis de los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de <i>Bacillus thuringiensis</i>		74
3.1.	Tamizaje de cepas tóxicas para larvas de <i>Cydia pomonella</i>	74
3.2.	Caracterización fenotípica y genotípica de las cepas nativas seleccionadas.....	77
3.3.	Bioensayos “finos” con <i>Cydia pomonella</i>	79
3.3.1.	Cuantificación de la virulencia de cepas tóxicas para <i>C. pomonella</i> mediante estimación de la concentración letal media.....	79
3.3.2.	Efecto de la solubilización y tripsinización <i>in vitro</i> de los cristales de dos cepas nativas seleccionadas sobre la actividad tóxica para <i>Cydia pomonella</i>	82
3.3.3.	Correlación entre los niveles de toxicidad de cepas exóticas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y los obtenidos para cepas pertenecientes a los mismos serovares que se hallan como ingrediente activo de bioinsecticidas comerciales.....	83
3.4.	Análisis exploratorio de las variables que influyen en la producción de proteínas insecticidas de <i>B. thuringiensis</i> INTA H42-1 en medio de cultivo líquido.....	84
3.4.1.	Selección de un medio de cultivo líquido.....	84
3.4.2.	Determinación de los componentes del medio que influyen significativamente en la producción de proteínas del cristal....	85
Capítulo 4: Conclusiones generales		89
Bibliografía		93

INDICE DE CUADROS

Capítulo 1: Introducción

Cuadro 1.1. Asociaciones entre los principales tipos de cristales de <i>Bacillus thuringiensis</i> , proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida.....	7
---	---

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Cuadro 2.1. Cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas en diferentes etapas del estudio.....	23
Cuadro 2.2. Cepas exóticas de <i>Bacillus thuringiensis</i> utilizadas en diferentes etapas del estudio.....	25
Cuadro 2.3. Mezcla de reacción para geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	29
Cuadro 2.4. Mezclas de reacciones para PCR.....	32
Cuadro 2.5. Parámetros generales de reacciones de PCR.....	32
Cuadro 2.6. Cebadores utilizados en este estudio.....	33
Cuadro 2.7. Reacciones de digestión con enzimas de restricción.....	37
Cuadro 2.8. Reacción de ligación.....	37
Cuadro 2.9. Composición de los medios de cultivo empleados para la cepa seleccionada.....	42
Cuadro 2.10. Matriz con los 12 experimentos diseñados por Plackett-Burman...	43
Cuadro 2.11. Valores de los niveles de los distintos componentes del medio.....	43

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Cuadro 3.1. Clones recombinantes obtenidos y seleccionados de <i>Bacillus thuringiensis</i> portando genes <i>cry</i>	49
Cuadro 3.2. Expresión de proteínas Cry de clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> analizada mediante geles SDS-PAGE.....	52
Cuadro 3.3. Evaluación de la actividad tóxica de clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> en <i>Cydia pomonella</i> y <i>Aedes aegypti</i>	54
Cuadro 3.4. Cuantificación de proteínas totales y estimación de la concentración de proteínas Cry individuales en clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i>	56
Cuadro 3.5. Toxicidad de proteínas Cry individuales para larvas neonatas de <i>Cydia pomonella</i>	57
Cuadro 3.6. Toxicidad de mezclas de proteínas Cry para larvas neonatas de <i>Cydia pomonella</i> y cálculo del factor de sinergismo utilizando la fórmula de Tabashnik...	60
Cuadro 3.7. Procedencia de las larvas de <i>Cydia pomonella</i> analizadas y número de aislamientos nativos de <i>Bacillus thuringiensis</i> obtenidos.....	63
Cuadro 3.8. Morfología de los cristales y número de acceso a las secuencias parciales de los genes 16S rRNA de los aislamientos nativos de <i>Bacillus thuringiensis</i>	64

Cuadro 3.9. Toxicidad de los aislamientos nativos obtenidos y cepas de referencia para larvas de distintos órdenes de insectos.....	72
Cuadro 3.10. Actividad tóxica de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para larvas de <i>Cydia pomonella</i>	75
Cuadro 3.11. Actividad tóxica de cepas exóticas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para larvas de <i>Cydia pomonella</i>	76
Cuadro 3.12. Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas más tóxicas.....	77
Cuadro 3.13. Análisis Probit de las cepas exóticas y nativas más tóxicas para larvas neonatas de <i>Cydia pomonella</i>	81
Cuadro 3.14. Análisis Probit de la biomasa activa de dos cepas nativas seleccionadas sometidas a distintos tratamientos.....	82
Cuadro 3.15. Análisis Probit de suspensiones de dos bioinsecticidas comerciales equilibrados en potencia.....	83
Cuadro 3.16. Mediciones de densidad óptica, pH y cuantificación de proteínas de INTA H42-1 en caldos de esporulación.....	85
Cuadro 3.17. Valores de la concentración de proteínas experimental y predicha en los medios diseñados por Plackett-Burman.....	85

INDICE DE FIGURAS

Capítulo 1: Introducción

Fig. 1.1. Imagen de microscopía electrónica de <i>Bacillus thuringiensis</i> en fase de esporulación y de producción de inclusiones cristalinas.....	3
Fig. 1.2. Esquema del ciclo de desarrollo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	6
Fig. 1.3. Estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa, Cry3Aa, Cry2Aa y Cry4Ba.....	10
Fig. 1.4. Estructura tridimensional de toxinas representativas producidas por <i>Bacillus thuringiensis</i> que no están formadas por la estructura clásica de los tres dominios.....	10
Fig. 1.5. Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios en lepidópteros.....	11
Fig. 1.6. Estados de desarrollo de <i>Cydia pomonella</i>	17
Fig. 1.7. Ingreso de Carpocapsa en manzanas.....	18

Capítulo 2: Materiales y Métodos

Fig. 2.1. Representación esquemática del plásmido pSVP27.....	36
--	----

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Fig. 3.1. Electroforesis de amplicones correspondientes a genes de toxinas insecticidas en geles de agarosa al 1,0%, generados con los cebadores 1Ac-N-BamHI/1Ac-C-SphI y 2Aa-N-BamHI/2Aa-C-SphI mediante “hot start” PCR a partir de distintas cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	47
Fig. 3.2. Electroforesis de amplicones generados con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector en geles de agarosa al 1,0%, a partir de clones de <i>Escherichia coli</i> transformados con el producto de ligación del pSVP27 y los genes de toxinas insecticidas.....	48
Fig. 3.3. Electroforesis de amplicones generados con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector en geles de agarosa al 1,0%, a partir de clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> transformados con pSVP27 conteniendo genes de toxinas insecticidas.....	49
Fig. 3.4. Electroforesis de amplicones generados con cebadores específicos para cada clase o subclase de gen <i>cry</i> clonado en geles de agarosa al 1,0%.....	50
Fig. 3.5. Alineamiento de secuencias nucleotídicas parciales obtenidas a partir de los distintos clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> seleccionados.....	51
Fig. 3.6. Análisis de expresión de <i>pellets</i> de cultivos en caldo de esporulación de los distintos clones recombinantes de <i>Bacillus thuringiensis</i> seleccionados obtenidos tras diferentes tiempos de incubación.....	53
Fig. 3.7. Imágenes representativas de una larva sana y una tratada de <i>Cydia pomonella</i> al finalizar el bioensayo.....	55
Fig. 3.8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los amplicones de un fragmento del gen 16S rRNA.....	65
Fig. 3.9. Perfiles proteicos de los cristales de aislamientos nativos y cepas de referencia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	66
Fig. 3.10. Amplificación génica de <i>cry1</i> y <i>cry2</i>	67

Fig. 3.11. Amplificación génica de <i>cry3</i> , <i>cry8</i> , <i>cry23</i> y <i>cry37</i>	67
Fig. 3.12. Amplificación génica de <i>vip1</i> y <i>vip2</i>	68
Fig. 3.13. Amplificación génica de <i>cry4</i>	68
Fig. 3.14. Amplificación génica de <i>thuE</i> y <i>zmaA</i>	69
Fig. 3.15. Perfiles electroforéticos y representación esquemática de cepas de referencia y de los aislamientos nativos obtenidos mediante Rep-PCR.....	70
Fig. 3.16. Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de Rep-PCR generados a partir de aislamientos nativos y cepas de referencia de <i>Bacillus thuringiensis</i>	71
Fig. 3.17. Caracterización de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> seleccionadas.....	78
Fig. 3.18. Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de Rep-PCR obtenidos de cepas de referencia y nativas seleccionadas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	79
Fig. 3.19. Amplificación génica de <i>thuE</i>	79
Fig. 3.20. Gráfico de Pareto con los efectos estandarizados de cada uno de los componentes del caldo BM	86

Abreviaturas

ALP	Fosfatasa alcalina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de varianza
APN	Aminopeptidasa N
ATP	Adenosín trifosfato
β_i	Coefficiente teórico
BGSC	Bacillus Genetic Stock Center - EE.UU
BSA	Seroalbúmina bovina
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
ca.	Circa
CAD	Caderina
CINVESTAV	Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional - México
CL₅₀	Concentración letal media
c.s.p	Cantidad suficiente para
d	Día (s)
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNAP	DNA plasmídico
DE	Desvío estándar
dNTP	Desoxi-nucleótido(s) tri-fosfato(s)
DO	Densidad Óptica
E	Efecto estandarizado o estadístico t
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
Fig.	Figura
FS	Factor de Sinergismo
g	Gramo (s)
gl	Grados de libertad
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
h	Hora (s)
ha	Hectáreas
IP	Institut Pasteur-Francia
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Litro (s)
L	Lepidoptera
M	Molar
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
mM	Milimolar
mm	Milímetro (s)
N	Normal
Ne	Nematoda
ND	No determinado
nm	Nanómetro (s)
N°	Número
pb	Pares de base

PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
REP	<i>Repetitive Extragenic Palindromic Sequence</i>
rpm	Revoluciones por minuto
RNA	Ácido ribonucleico
s	Segundo (s)
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>
Sip	Secreted insecticidal protein
svar.	Serovar
TAE	Tris Acetato EDTA
TBE	Tris Borato EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametil-diamina
TFM	Triptosa Fosfato Modificado
V	Voltios
Vip	<i>Vegatitive insecticidal protein</i>
USDA	United States Department of Agriculture - EE.UU
µl	Microlitro (s)
µg	Microgramo (s)
°C	Grados Celsius

Resumen

Título del trabajo: “Estudio de la toxicidad de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* como herramienta para optimizar el manejo de lepidópteros plaga de importancia agroeconómica”.

Entre las plagas principales y recurrentes en las producciones de frutas de pepita se encuentra la “Carpocapsa” (*Cydia pomonella* Linneaus [Lepidoptera: Tortricidae]). Su control se basa en el empleo de insecticidas químicos con todos los riesgos medioambientales que acarrear, por lo que otros métodos que contemplen organismos benéficos, como tecnologías que tengan a *Bacillus thuringiensis* como base, constituyen una alternativa eficaz y ambientalmente segura. En este estudio se trabajó en la construcción e identificación de proteínas de esta bacteria entomopatógena tóxicas para larvas de *C. pomonella*, consolidándose en el laboratorio, una estrategia para el clonado y expresión de genes *cry* en *B. thuringiensis*. Se evaluó la toxicidad individual y de mezclas de protoxinas Cry, en base a lo que se propone que Cry1Aa y Cry1Ab podrían ser usadas para el control de *C. pomonella*. El uso simultáneo de Cry1Ab/Cry1Ia en organismos genéticamente modificados podría ser utilizado debido a que mostraron efecto sinérgico. El uso combinado de Cry1Aa/Cry2Aa y Cry1Ab/Cry2Aa debería ser evitado porque mostraron un antagonismo moderado. Se estudió la biodiversidad natural de *B. thuringiensis* en larvas vivas y sanas de *C. pomonella*. La estrategia de aislamiento resultó factible pero ninguno de los aislamientos resultó portador de los genes *cry* más difundidos, ni de las toxinas significativamente tóxicas para las especies estudiadas. Asimismo, se trabajó en la selección de las cepas más tóxicas conteniendo las proteínas insecticidas más activas para *C. pomonella*. Se realizó la caracterización genotípica y fenotípica de las mismas, la cual mostró gran similitud con la cepa de referencia *B. thuringiensis* HD-1. Finalmente se analizaron los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de la cepa nativa de *B. thuringiensis* INTA H42-1, en el cuál la glucosa constituyó un componente importante del caldo BM que influyó significativamente y positivamente en la producción de proteínas.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, proteínas insecticidas, proteínas Cry, clones recombinantes, bioinsecticida, *Cydia pomonella*, Lepidoptera, insectos plaga, aislamientos.

Abstract

Title: "Study of the toxicity of *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins as a tool to optimize the management of lepidopteran pests of agroeconomic importance".

Among the main and recurrent pests in pip fruit production, the "Carpocapsa" (*Cydia pomonella* L. [Lepidoptera: Tortricidae]) is one of the most important. Their control is based on the use of chemical insecticides that involved multiple environmental risks, so other methods that include beneficial organisms, such as technologies based on toxins produced by *Bacillus thuringiensis* bacteria constitute an effective and environmentally safe alternative. In this study, we worked on the construction and identification of proteins of this entomopathogenic bacterium with high toxicity against *C. pomonella*, consolidating in the laboratory a strategy for the cloning and expression of *cry* genes from *B. thuringiensis*. The toxicity of Cry protoxins was evaluated individually and in mixtures, based in our results we proposed that Cry1Aa and Cry1Ab could be used for the control of *C. pomonella*. The simultaneous use of Cry1Ab/Cry1Ia in genetically modified organisms is recommended since they showed synergistic effect. The combined use of Cry1Aa/Cry2Aa and Cry1Ab/Cry2Aa should be avoided because they showed moderate antagonism. The natural biodiversity of *B. thuringiensis* was studied in live and healthy larvae of *C. pomonella*. *Bacillus thuringiensis* strain isolation strategy was feasible, but none of the isolates obtained harbored genes encoding the most widespread Cry toxins neither the most toxic proteins against the studied species was found. In addition, we worked on the selection of *B. thuringiensis* strains containing the most active insecticidal proteins against *C. pomonella*. The genotypic and phenotypic characterization of these isolates showed high similarity with the reference strain *B. thuringiensis* HD-1. Finally, the components of a liquid culture medium that improves the production of insecticidal proteins from a native strain of *B. thuringiensis* INTA H42-1 were analyzed. Our results indicated that glucose constituted an important component of BM broth that significantly and positively influenced Cry protein production.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, insecticidal proteins, Cry proteins, recombinant clones, bioinsecticide, *Cydia pomonella*, Lepidoptera, insect pests, isolates.

Capítulo 1: Introducción

Capítulo 1: Introducción

1. Mapa de situación y antecedentes.

La producción de frutales de pepita en Argentina se restringe principalmente a la zona del Alto Valle del Río Negro (Provincias de Río Negro y Neuquén), cubriendo unas 44.000 ha (MinAgri 2018). Allí constituye la principal actividad económica de la región, donde contribuye significativamente a la generación de valor agregado y tiene una alta absorción de mano de obra. Las actividades que se desarrollan involucran la producción primaria, el empaque y la conservación en frío para el consumo en fresco; y la industrialización de la fruta de menor calidad para la elaboración de jugo y, en menor medida, de sidra, fruta deshidratada y en conserva. En el mercado internacional, la posición de Argentina asume relevancia por su carácter de contraestación en relación al hemisferio norte. El mercado externo constituye un destino importante de la producción. El empaque para la exportación de fruta en fresco constituye el núcleo organizador de la cadena y de las demás actividades industriales y de servicios que se desarrollan alrededor de la misma (MECON 2014).

Este agroecosistema presenta problemas fitosanitarios que se generan debido a la necesidad de controlar poblaciones de artrópodos plaga y a la inadecuada aplicación de productos químicos (plaguicidas) (SENASA 2017).

Entre las plagas más recurrentes en las producciones de frutas de pepita se encuentra la “Carpocapsa o polilla del manzano” (*Cydia pomonella* L. [Lepidoptera: Tortricidae]). Este lepidóptero constituye una plaga en todo Sudamérica, no solo por los daños que produce y por las dificultades que presenta su control, sino por los perjuicios sociales y ambientales que desembocan de un inadecuado control químico (Saini *et al.* 2008; SENASA 2017).

Para entender un poco la magnitud real de la importancia económica de esta plaga en nuestro país, podemos remitirnos a información del año 2002. En esa época, se estimó que el daño promedio provocado por *C. pomonella* en Alto Valle de Río Negro fue de 6,1%, depreciando el valor de más de 82.000 toneladas de fruta y provocando la pérdida de alrededor de 1000 puestos de trabajo. Considerando los costos fiscales y el impacto sobre otras etapas de la cadena productiva, se estimó que el déficit para la economía regional en ese momento fue superior a los U\$S 40 millones (Villarreal *et al.* 2003).

A nivel mundial, las herramientas destinadas al control de este lepidóptero en los distintos tipos de cultivo incluyen principalmente el empleo de insecticidas químicos de síntesis de amplio espectro, con todos los riesgos medioambientales que acarrear (Aragón *et al.* 2002; Cichón *et al.* 2001; Parra Morales *et al.* 2017). Es aquí que este tema adquiere gran relevancia, ya que el valor comercial de los frutos se anula con el menor daño ocasionado por *C. pomonella*, por lo que los insecticidas químicos de síntesis son utilizados en aplicaciones preventivas (Cichón y Fernández 2003). Por otro lado, la tendencia a la reducción en las tolerancias de residuos de agroquímicos en fruta fresca por parte de los mercados internacionales, hace que los insecticidas químicos no puedan utilizarse en el período cercano a la cosecha. Paralelamente existe un número cada vez más restringido de productos específicos permitidos, lo cual complica cada vez más el control de la plaga (SENASA, 2017). A todos los inconvenientes mencionados hay que sumarle que el empleo generalizado y muchas veces incorrecto de este tipo de

agentes químicos, han generado la resistencia de *C. pomonella* a ciertos principios activos y el resurgimiento de plagas secundarias (Lacey y Unruh 2007). También es importante considerar, que además de los efectos adversos que provocan sobre el ambiente (Loewy *et al.* 1999), se suman aquellos provocados sobre la salud humana (del Puerto Rodríguez *et al.* 2014).

El empleo de otras herramientas de control, como aquellas basadas en la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis*, surgen como complemento o alternativa al control químico de *C. pomonella*. En este sentido, en la literatura se citan estudios exitosos en los que se evaluó la efectividad de cepas de *B. thuringiensis* que expresan combinaciones naturales de proteínas insecticidas para este lepidóptero tanto en laboratorio como en condiciones de campo (Konecka *et al.* 2007, Liu *et al.* 2013). Por otra parte, solo se hallan algunos reportes puntuales en los que se describe la actividad tóxica de proteínas insecticidas individuales para *C. pomonella* que utilizan poblaciones europeas de la plaga (Boncheva *et al.* 2006; Rang *et al.* 2000).

Para un uso más eficiente de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis*, ya sea como ingredientes activos de bioinsecticidas convencionales o expresadas en plantas transgénicas, es importante conocer cuáles de estas proteínas presentan la toxicidad más elevada para una plaga blanco y cuáles de ellas interactúan sinérgicamente (Peyronnet *et al.* 1997; Wirth *et al.* 2000). Es también de interés, conocer el potencial de mezclas de proteínas insecticidas para reducir o retrasar la generación de insectos resistentes a proteínas individuales a partir del conocimiento de su interacción con los receptores en el insecto (Wirth *et al.* 2000).

2. *Bacillus thuringiensis*.

2.1. Generalidades del entomopatógeno.

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, anaerobio facultativo, quimiorganotrofo con actividad catalasa positiva y motil gracias a que presenta flagelación peritrica. Se caracteriza por desarrollar esporas de resistencia que no provocan la distensión del perfil bacilar (Sauka y Benintende 2008) (Fig. 1.1).

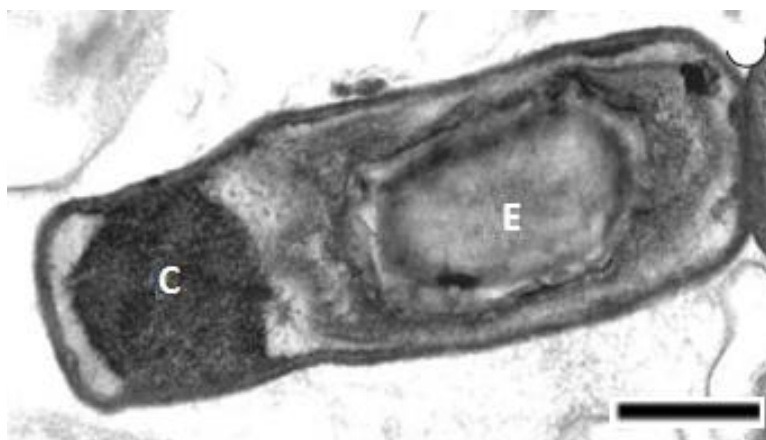


Fig. 1.1. Imagen de microscopía electrónica de *Bacillus thuringiensis* en fase de esporulación y de producción de inclusiones cristalinas. C: cristal parasporal; E: espora. Barra, 0.5 μ m. Tomado de Fiuza *et al.* 2012.

B. thuringiensis se caracteriza principalmente por producir cristales paraesporales de naturaleza proteica (proteínas Cry, del inglés Crystal y Cyt, del inglés Cytolytic) durante la fase de esporulación, perteneciendo ambas al grupo de las δ -endotoxinas. La bacteria puede portar a su vez otros factores de virulencia (proteínas Vip, Sip, β -exotoxina, fosfatasas, etc.), que son liberadas al medio durante la fase vegetativa de crecimiento. Todas ellas, son responsables de la toxicidad que esta especie bacteriana presenta para distintos invertebrados, fundamentalmente larvas de insectos. Las proteínas Cry constituyen el ingrediente activo del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (Sauka y Benintende 2008).

2.2. Marco histórico.

Esta bacteria fue descubierta por el biólogo Shigetane Ishiwata en Japón, en 1901, quien la aisló a partir de una larva muerta del gusano de seda (*Bombyx mori* L.) denominándolo *Bacillus sotto*, nombre que fue declarado posteriormente inválido.

Su identificación como agente entomopatógeno, y su denominación actual *Bacillus thuringiensis*, se deben a su nuevo aislamiento por Ernst Berliner en el distrito de Turingia (Alemania) en el año 1911, a partir de larvas enfermas de mariposas de la harina del Mediterráneo (*Ephestia kuehniella* Z.). Fue Berliner quien por primera vez realiza una descripción válida de esta bacteria destacando la existencia de un cuerpo parasporal cristalino dentro de *B. thuringiensis*, sin conocer que éste era responsable de la actividad insecticida. Hoy en día, esta cepa se considera especie tipo y se la clasifica como *B. thuringiensis* serovariedad *thuringiensis*, serotipo H1 (Andrews *et al.* 1987).

En 1928 se reportó la primera aplicación de *B. thuringiensis* como insecticida biológico al demostrar su toxicidad para larvas de *Ephestia* sp. Hacia 1938 en Francia, se introdujo en el mercado el primer producto comercial bajo el nombre de “Sporeine”, cuyo ingrediente activo eran esporas y cristales de *B. thuringiensis*. Sin embargo, debido a la gran aceptación que tuvieron los insecticidas químicos de síntesis a partir de la primera mitad del siglo XX, el desarrollo de formulados biológicos de *B. thuringiensis* como ingrediente activo se vio perjudicado. De todos modos, luego con el avance en el conocimiento del impacto negativo de los insecticidas químicos sobre el medio ambiente y la salud humana, se retomó el interés por *B. thuringiensis*, lo que permitió el desarrollo de un formulado actualmente vigente, llamado “Thuricide”.

Hasta 1976 se creía que *B. thuringiensis* era sólo tóxico para insectos lepidópteros, pero una nueva actividad tóxica fue reportada por Goldberg y Margalit (1977), quienes en Israel aislaron una cepa con toxicidad para dípteros, principalmente larvas de mosquitos y jejenes. En la actualidad esta cepa es conocida como *B. thuringiensis* serovar *israelensis*, serotipo H14. Este hecho amplió las expectativas en el empleo de esta bacteria como insecticida biológico, y en muchas partes del mundo se iniciaron búsquedas para encontrar cepas de *B. thuringiensis* con toxicidad para otros órdenes de insectos. De esta manera, en Alemania en 1983, Kreig *et al.* aislaron de *Tenebrio molitor* L. (gusano de la harina), una cepa con toxicidad para ciertas especies de coleópteros a la que llamaron *B. thuringiensis* svar. *tenebrionis*. Estos acontecimientos permitieron extender el empleo de *B. thuringiensis* como ingrediente activo de insecticidas biológicos (Cannon 1996; Grossi-de-Sa *et al.* 2007).

2.3. Taxonomía actual.

Bacillus thuringiensis pertenece a la familia Bacillaceae, ubicándose dentro del grupo 1 del género *Bacillus* 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). Recientemente se ha propuesto la incorporación de 9 especies nuevas a esta lista: *Bacillus paranthracis*, *Bacillus pacificus*, *Bacillus tropicus*, *Bacillus albus*, *Bacillus luti*, *Bacillus proteolyticus*, *Bacillus nitratreducens* y *Bacillus paramycoides* (Liu *et al.* 2017). Otras tres cepas del grupo *B. cereus* (*Bacillus gaemokensis*, *Bacillus manliponensis* y *Bacillus bingmayongensis*) se propusieron como nuevas especies pero las mismas no han sido validadas todavía (Jung *et al.* 2010; Jung *et al.* 2011; Liu *et al.* 2014b).

Bacillus thuringiensis se encuentra estrechamente relacionado con *B. cereus* y *B. anthracis*, no obstante, se diferencia claramente por la presencia de cristales parasporales y sus propiedades insecticidas (Sauka y Benintende 2008).

Bacillus thuringiensis se puede clasificar actualmente mediante serología del antígeno H en 84 serovares (Sauka y Benintende 2008). Se describieron métodos más sencillos de tipificación de *B. thuringiensis*, casi todos basados en herramientas de biología molecular, con el objetivo de encontrar técnicas sustitutas más simples a la serotipificación flagelar (Basile 2008; Sauka *et al.* 2011).

2.4. Ciclo de desarrollo.

Su ciclo de desarrollo, presenta dos fases: la fase de crecimiento vegetativo y la fase de esporulación. Durante el crecimiento vegetativo de la célula, cuando la bacteria se encuentra en un ambiente “rico” en nutrientes, se multiplica exponencialmente por fisión binaria. 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 se ve limitada la disponibilidad de algún nutriente esencial o frente a cualquier otra condición medioambiental desfavorable, 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. 1. 2).

2.5. Ecología y hábitat.

B. thuringiensis tiene la capacidad de ocupar un gran número de ecosistemas terrestres diferentes como desiertos, bosque húmedo tropical, altas montañas, playas y cuevas entre muchos otros (Bravo *et al.* 1998; Quesada-Moraga *et al.* 2004; Uribe *et al.* 2003). Sin embargo, el suelo es de donde se lo recupera con mayor frecuencia y es considerado el sitio donde las esporas mantienen su viabilidad durante años (Armengol *et al.* 2007; Jara *et al.* 2006). Asimismo, es habitante de otros ambientes como el filoplano, polvo de almacenes, residuos de molienda de granos, aguas estancadas, fondos de lugares anegados donde se desarrollan larvas de mosquitos, telarañas,

insectos enfermos o muertos (Haloi *et al.* 2016; Maduell *et al.* 2002; Sauka *et al.* 2017; Sauka *et al.* 2010).

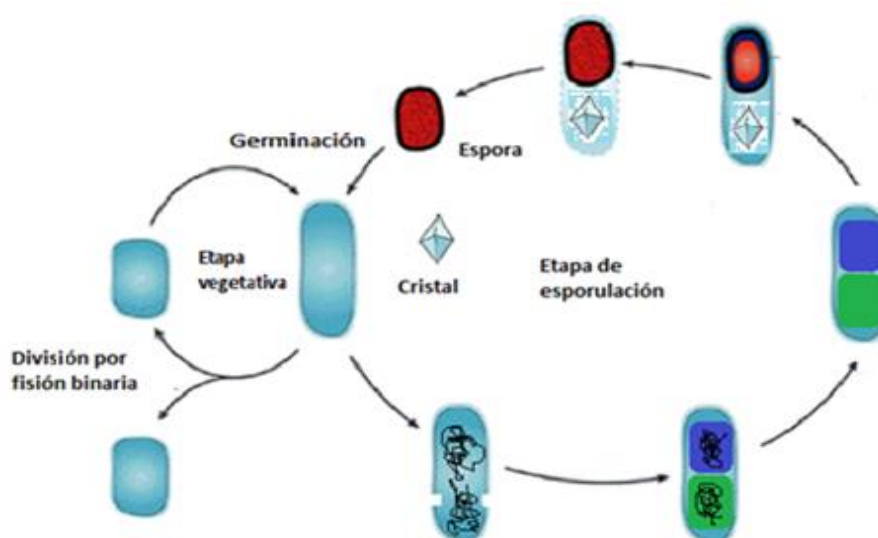


Fig. 1.2. Esquema del ciclo de desarrollo de *Bacillus thuringiensis*.

2.6. 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, ovoides-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, su peso molecular y espectro de actividad insecticida (Cuadro 1.1) (Amadio *et al.* 2013; Sauka y Benintende 2008). No obstante, existen reportes en los que se describieron cristales parasporales que, a pesar de tener morfologías reconocidas como tóxicas, carecen de actividad insecticida conocida (Benintende *et al.* 1999; López-Meza e Ibarra 1996).

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 2006).

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).

Cuadro 1.1. Asociaciones entre los principales tipos de cristales de *Bacillus thuringiensis*, proteínas Cry y su espectro de actividad insecticida.

Morfología del cristal	Proteína	Peso molecular (kDa)	Toxicidad
Bipiramidal	Cry1	130	Lepidoptera
Cúbico	Cry2	65	Lepidoptera y Diptera
Cuadrado aplanado	Cry3	72	Coleoptera
Ovoide	Cry8	130	Coleoptera y Lepidoptera
Ovoide	Cry4, Cry10, Cry11	135, 128, 78, 72	Diptera

2.7. Espectro de acción.

Los cristales de *Bacillus thuringiensis* poseen toxicidad para muchos grupos taxonómicos de invertebrados, principalmente a los que integran la Clase Insecta. Existe una alta susceptibilidad por un gran número de especies que constituyen el Orden Lepidoptera (Glare y O'Callaghan 2000; Schnepf *et al.* 1998), siendo de mayor interés agronómico las que pertenecen a las familias Arctiidae, Carposinidae, Cossidae, Lymantriidae, Noctuidae y Tortricidae entre otras. Para otros órdenes, el número de especies susceptibles disminuye, siendo este el caso del Orden Coleoptera (Glare y O'Callaghan 2000; Méndez-López *et al.* 2003) y Diptera (Glare y O'Callaghan 2000; Goldberg y Margalit 1977). También se demostró que algunos cristales de ciertas cepas de *B. thuringiensis* presentan actividad tóxica para especies pertenecientes a los órdenes Hemiptera (Walters y English 1995; Wellman-Desbiens y Cote 2004), Hymenoptera (Payne *et al.* 1993), Neuroptera (Hilbeck *et al.* 1998) y Orthoptera (Schnepf *et al.* 1998). Asimismo, también se ha descrito susceptibilidad a las toxinas de *B. thuringiensis* por nematodos (parásitos de humanos y animales, y de vida libre), tremátodos, ácaros, platelmintos, protozoos, y algunos caracoles y/o células cancerosas humanas de diversos orígenes (Feitelson *et al.* 1992; López *et al.* 2006; Palma *et al.* 2014).

La toxicidad diferencial observada entre los diferentes *B. thuringiensis* se atribuye principalmente a la susceptibilidad propia del organismo blanco como también a la naturaleza de la toxina (Bravo *et al.* 2004; Jaquet *et al.* 1987).

2.8. Factores de virulencia.

Bacillus thuringiensis puede producir distintas proteínas y metabolitos responsables de su patogenicidad para insectos.

2.8.1. 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 75 grupos principales divididos en diferentes clases y subclases juzgadas en base a un análisis de

similitud de sus secuencias de aminoácidos (*B. thuringiensis* toxin nomenclature website en <http://www.btnomenclature.info>) (Crickmore *et al.* 2018). 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. Se sintetizan como protoxinas que son activadas proteolíticamente para generar el fragmento activo (toxina), conocido como δ -endotoxina (Sauka y Benintende 2008). Se ha visto un efecto sinérgico entre las esporas y las δ -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).

Las proteínas de la clase Cry1, Cry2, Cry9 y Cry15 son las consideradas tradicionalmente tóxicas para larvas del Orden Lepidoptera, no obstante, la toxicidad de algunas proteínas Cry2 no se restringe exclusivamente para lepidópteros sino que existen algunas con toxicidad para dípteros (Sauka y Benintende 2008). También existen otras que presentan una actividad dual frente a otros órdenes de insectos (Lepidoptera y Coleoptera), tal como los casos de Cry1B, Cry1Ia y Cry8. (Amadio *et al.* 2013; Espinasse *et al.* 2002; Martins *et al.* 2008). Se conocen también distintas proteínas Cry que presentan toxicidad para coleópteros: Cry3, Cry7, Cry9Da, Cry14, Cry18, Cry22, Cry23, Cry34, Cry35, Cry36, Cry37, Cry43 y Cry55 (Palma *et al.* 2014). Existen otras como las Cry4, Cry10, Cry11, Cry19 y Cry20 conocidas por su actividad tóxica para dípteros (Palma *et al.* 2014).

2.8.2. Otros factores de virulencia.

Además de las proteínas Cry, *B. thuringiensis* posee una serie de factores de virulencia que pueden liberarse durante la fase vegetativa de crecimiento y que le permiten infectar sus blancos con mayor eficiencia, ya que le confieren la capacidad de sobrevivir y multiplicarse dentro del huésped, evadiendo su sistema inmune y produciendo una septicemia general.

Algunos presentan alta especificidad para un determinado Orden de insecto como las proteínas Vip (*Vegetative insecticidal protein*) y las proteínas Sip (*Secreted insecticidal protein*), mientras que otros no tienen especificidad por el Orden de insectos que afectan y se encuentran ampliamente distribuidos dentro de los distintos serovares de *B. thuringiensis* (por ej.: β -exotoxina, enterotoxinas, fosfolipasas, 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 diferentes de proteínas Vip (Crickmore *et al.* 2018), siendo Vip3 tóxica para lepidópteros (Estruch *et al.* 1996).

Otras de las proteínas insecticidas que se liberan durante la fase vegetativa son las Sip que fueron recientemente descritas y 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.

Las proteínas Cyt, constituyen otras de las familias de proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* producidas durante la fase de esporulación. A diferencia de las proteínas

Cry, exhiben una actividad citolítica general *in vitro* y una especificidad predominante hacia dípteros *in vivo* (Butko 2003; de Maagd *et al.* 2003). Una característica particular de las toxinas Cyt es que pueden actuar de manera sinérgica con las proteínas Cry o Vip3 y reducir los niveles de resistencia de algunos insectos plaga (Soberón *et al.* 2013, Yu *et al.* 2012).

Las β -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.* 2014b). En insectos afecta el proceso de muda y desarrollo de pupas produciendo efectos teratogénicos (Burgerjon *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 β -exotoxina: la de tipo I y la de tipo II (Liu *et al.* 2014b). La de tipo I es la que se detecta más frecuentemente.

La producción de β -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.* 2014b). 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 β -exotoxina de tipo I en *B. thuringiensis* (Sauka *et al.* 2014).

Algunas cepas pueden secretar zwittermicina A, un metabolito que demostró capacidad de potenciar la actividad insecticida de ciertas toxinas de *B. thuringiensis* (Broderick *et al.* 2000). Inicialmente fue identificado en *B. cereus* UW85 por su rol en la supresión de enfermedades de plantas (Handelsman *et al.* 1990). Ha demostrado un espectro amplio de actividad inhibiendo ciertas bacterias gram positivas, gram negativas y algunos microorganismos eucariotas (Hao *et al.* 2015).

2.8.3. Estructura de las proteínas Cry.

La estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa y Cry1Ac (tóxicas para lepidópteros), Cry3Aa, Cry3Bb y Cry8Ea (Xu *et al.* 2014), (tóxicas para coleópteros), Cry2Aa (con toxicidad dual para lepidópteros y dípteros), Cry4Aa y Cry4Ba (tóxicas para dípteros), Cry5B (tóxicas para nemátodos) en su forma activa, fue dilucidadas a través de cristalografía de rayos X (Boonserm *et al.* 2005 y 2006; Galitsky *et al.* 2001; Guo *et al.* 2009; Li *et al.* 1991). Todas ellas, a pesar de poseer distinto espectro de acción, muestran una topología común de tres dominios (Fig. 1.3). Éstas proteínas Cry son moléculas globulares que contienen tres dominios distintos enlazados por conectores simples y representan el grupo más amplio.

El dominio I de estas proteínas Cry está formado por siete estructuras α -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 β en antiparalelo y participaría en la interacción con el receptor, por lo que sería determinante en la especificidad. El dominio III, es un β -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).

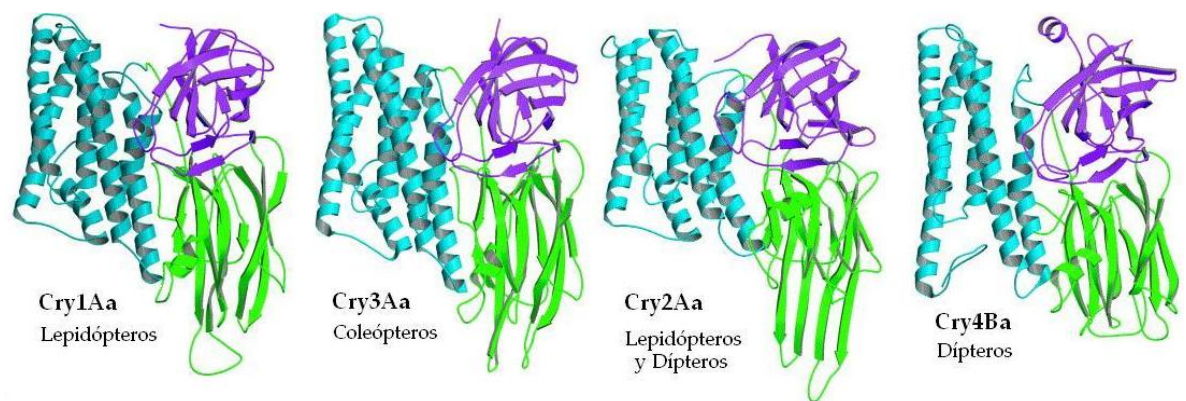


Fig. 1.3. Estructura tridimensional de las proteínas Cry1Aa, Cry3Aa, Cry2Aa y Cry4Ba. Los dominios I están coloreados de celeste, los II de verde y los III de violeta. Adaptado de Sauka, 2007.

Por otra parte, se determinó la estructura tridimensional de otras toxinas que resultaron no estar formadas por la estructura clásica de los tres dominios (Fig. 1.4). 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).

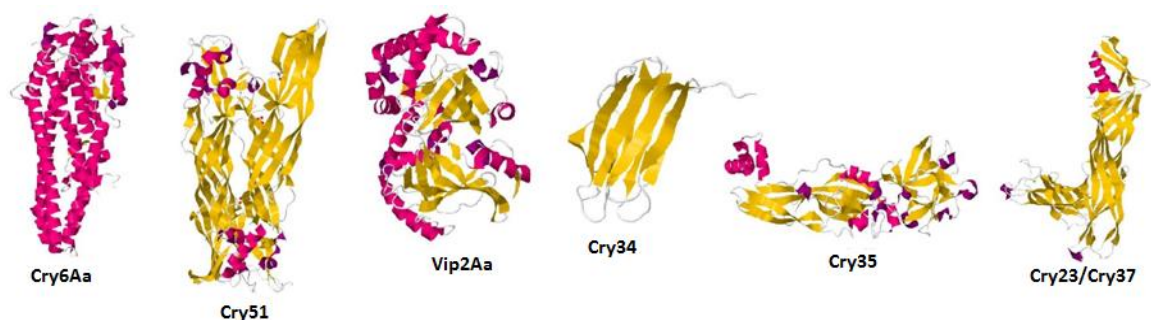


Fig. 1.4. Estructura tridimensional de toxinas representativas producidas por *Bacillus thuringiensis* que no están formadas por la estructura clásica de los tres dominios. Cry6Aa es una toxina alfa helicoidal; Cry51 es un miembro de la familia Etx / Mtx2; Vip2Aa; Cry34 es una proteína similar a la aegerolisina que actúa como una toxina binaria con Cry35, una proteína de la familia Toxin_10; la toxina binaria Cry23/Cry37 es un ejemplo de toxinas Cry-like-Mtx.

2.9. Mecanismo de acción de las proteínas Cry.

El mecanismo de acción de las toxinas Cry se ha descrito principalmente en lepidópteros. 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). Insectos del Orden Lepidoptera presentan intestinos medios con alta alcalinidad, con enzimas digestivas propicias para la disolución y activación de las proteínas (Dow 1986).

Una vez solubilizadas las protoxinas, estas son activadas liberando el fragmento tóxico (δ -endotoxina) de 55 a 60 kDa. Este procesamiento se produce gracias a la acción

de diferentes tipos de proteasas que se hallan presentes en el intestino del insecto. La clase de proteasas presentes tendrían un papel destacado en la resistencia o baja susceptibilidad frente a *B. thuringiensis* por parte del insecto (López-Pazos *et al.* 2010; Loseva *et al.* 2002). Las serina proteasas (por ej.: tripsina y quimotripsina) son las más importantes en lepidópteros (Mahdavi *et al.* 2013).

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.* 2012). Estos receptores son proteínas muy abundantes y se hallan 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.* 2012). Luego, se induce un cambio conformacional en la proteína Cry monomérica que favorece la escisión del extremo N-terminal incluyendo la hélice α -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 su formación (Pardo-lópez *et al.* 2012). 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.* 2012). En la figura 1.5 se muestra una representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios que se daría en lepidópteros.

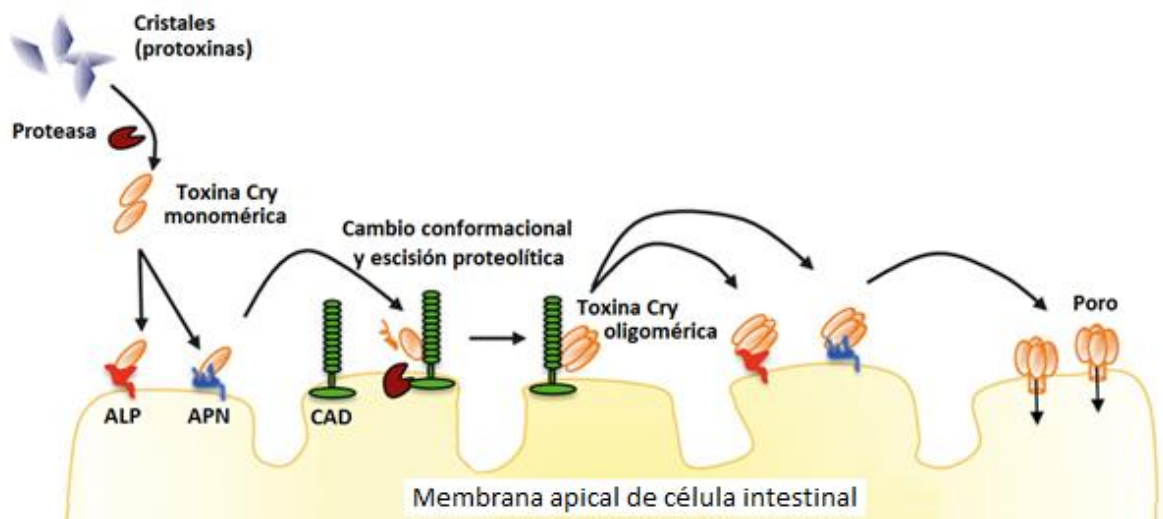


Fig. 1.5. Representación esquemática del mecanismo de acción a nivel molecular de las toxinas Cry de tres dominios en lepidópteros. Adaptado de Pardo-Lopez *et al.* 2012.

Las células del epitelio intestinal se hacen permeables a iones pequeños y otras moléculas como consecuencia de la formación del poro. Estas se hinchan debido al desequilibrio osmótico y finalmente se produce la lisis celular (Pardo-lópez *et al.* 2012). 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 otro lado, Broderick *et al.* (2006 y 2009) sugirieron que la mortalidad no sería sólo inducida por *B. thuringiensis* y que ésta dependería esencialmente de otras bacterias que forman parte de la microbiota del intestino medio del insecto huésped. No obstante, este planteamiento ha sido 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 (Johnston y Crickmore 2009; Raymond *et al.* 2009; van Frankenhuyzen *et al.* 2010).

2.10. Material genético.

El material genético de *B. thuringiensis* consta de un cromosoma con un tamaño molecular comprendido entre 4,3 y 6,2 millones de pares de bases (Barbosa *et al.* 2015; Marcon *et al.* 2014), y de elementos extracromosomales autorreplicantes (plásmidos), de configuración, tamaño y número variable entre las distintas cepas de *B. thuringiensis* (Reyes-Ramírez e Ibarra, 2008).

Las cepas de *B. thuringiensis* generalmente muestran un perfil plasmídico complejo con hasta veinte plásmidos (Reyes-Ramírez e Ibarra 2008; Zheng *et al.* 2015). Pueden clasificarse dos grupos de acuerdo a su tamaño: los plásmidos con tamaños menores a 45 kb y los megaplásmidos con tamaños mayores a 45 kb (Reyes-Ramírez e Ibarra 2008). En general, estos últimos son los portadores de genes de toxinas insecticidas. La primera evidencia que ayuda al establecimiento de una correlación entre síntesis de proteínas del cristal y la presencia de un plásmido, fue establecida por experimentos de “curado” de plásmidos, realizada por González *et al.* (1981). Mediante la reintroducción de los plásmidos apropiados, fue posible restablecer la capacidad de síntesis del cristal en las bacterias a las cuales se les había eliminado esta función mediante el curado.

Además, en los megaplásmidos de *B. thuringiensis* se encuentran codificados una gran cantidad de elementos móviles como secuencias de inserción y transposones, generalmente situados cerca de los genes codificantes de toxinas, facilitando la movilidad intra/inter genoma y el surgimiento de cepas con nuevas especificidades insecticidas (Mahillon *et al.* 1994). Estos megaplásmidos se hallan mayoritariamente en bajo número de copias y se replican por un mecanismo de replicación de tipo *theta* (Hoffmaster *et al.* 2004; Rasko *et al.* 2005).

Siempre existen excepciones y existen reportes donde se informó la detección de un gen *cry* en un plásmido de bajo peso molecular que se replica mediante un mecanismo de círculo rodante (Loeza-Lara *et al.* 2005), como también la existencia de genes *cry* insertados en el cromosoma de *B. thuringiensis* (Klier *et al.* 1982; Sanchis *et al.* 1988).

2.11. Genes *cry* codificantes de proteínas tóxicas para lepidópteros.

Se conocen distintos genes *cry* que codifican proteínas tóxicas para lepidópteros, siendo *cry1*, *cry2*, *cry8*, *cry9* y *cry15* los más destacados. Los genes *cry1* codifican proteínas de ca. 130 kDa que se conglomeran durante la esporulación en inclusiones cristalinas bipiramidales (Sauka y Benintende 2008). Como ya fue mencionado, estas proteínas son sintetizadas como protoxinas que se solubilizan en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto, y se activan por proteólisis en toxinas, en este caso de aproximadamente 65 kDa, mediante proteasas presentes en intestino medio de la larva (Sauka y Benintende 2008). La gran mayoría de los genes *cry* que se conocen pertenecen al grupo *cry1*, y estos son sin duda los más estudiados. Se han reportado hasta la fecha 270 genes *cry1* distintos, los que han sido clasificados en 14 clases (A a N) (Crickmore *et al.* 2018).

La frecuencia de detección de los distintos genes *cry1* en *B. thuringiensis* es variable. Algunos genes, como los *cry1A*, se detectan con más frecuencia que otros; mientras que otros como los *cry1B*, *cry1H*, *cry1K*, *cry1L*, *cry1M* o los *cry1N* son muy raros. Los genes detectados en mayor frecuencia después de los de la clase *cry1A*, son los de las clases *cry1I*, *cry1C* y *cry1D* (Bravo *et al.* 1998). Los genes *cry1B*, *cry1E*, *cry1F* y *cry1G* se detectan con una frecuencia menor, a pesar de existir excepciones (Hongyu *et al.* 2000). Los *cry1I* presentan características distintivas con respecto al resto de los miembros de este grupo. Estos genes son expresados y secretados en fase temprana de la esporulación (Kostichka *et al.* 1996). Asimismo, el clonado y expresión de esta clase de genes en *Escherichia coli* reveló que codifican proteínas de 81 kDa con actividad tóxica dual que incluye ciertos coleópteros además de lepidópteros (Choi *et al.* 2000).

Los genes del grupo *cry2* poseen marcos de lectura abiertos de unas 1900 pb, ya que no presentan un fragmento C-terminal presente en otros genes *cry*. Estos codifican proteínas de 65 kDa que se conglomeran en cristales cúbicos (Sauka y Benintende 2008). Los genes *cry2* están presentes en cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes al svar. *kurstaki*, svar. *thuringiensis*, svar. *kenyae* y svar. *tolworthi*, entre otros. Existen descritos en la actualidad 86 genes *cry2* distintos clasificados en sólo dos clases (A y B) (Crickmore *et al.* 2018). Los genes *cry2Aa* tendrían la peculiaridad de estar ubicados en la región más distal de un operón del cual formarían parte. La proteína Cry2Aa requiere de la proteína que corresponde al segundo gen de este operón (*orf2*) para la formación del cristal (Crickmore y Ellar 1992). Los cristales de algunas de las cepas que contienen *cry2Ab* presentan poca o nada de la correspondiente proteína (Dankocsik *et al.* 1990; Masson *et al.* 1998; Sauka *et al.* 2010). La expresión de *cry2Ab* en niveles elevados se logró cuando promotores fuertes dirigen su transcripción, indicando que los niveles bajos de expresión son probablemente el resultado de un promotor débil (Dankocsik *et al.* 1990). Por otro lado, Jain *et al.* (2006) encontraron que la falta de expresión se debería a la ausencia de un promotor funcional. Otros autores reportaron que falta de expresión se debería en ciertos casos a un factor post-transcripcional (Sauka *et al.* 2010).

Los genes *cry2* también se encuentran de manera frecuente en *B. thuringiensis*, sobre todo entre aquellas cepas que poseen genes *cry1*. Es muy común que se encuentren los genes *cry2Aa* y *cry2Ab* simultáneamente o el gen *cry2Ab* solo, pero no el *cry2Aa* en forma aislada (Sauka y Benintende 2017).

Zhu *et al.* (2015) han reportado que la cepa HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* alberga seis genes *cry* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa* y *cry2Ab*). Cuatro de

estos genes (*cry1Aa*, *cry1Ia*, *cry2Aa* y *cry2Ab*) fueron localizados juntos en el megaplásmido pBMB299 formando una isla de patogenicidad. Los dos genes adicionales se encontraron en los plásmidos pBMB65 (*cry1Ab*) y pBMB95 (*cry1Ac*).

Otro grupo conocido es el de los genes *cry8*. Codifican 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 algunos lepidópteros (por ej.: *A. gemmatilis*) (Amadio *et al.* 2013), como también para ciertos coccinélidos (Navas *et al.* 2014) y escarabeídos (Shu *et al.* 2009). Se han reportado hasta la fecha 57 genes *cry8* distintos, clasificados en 20 clases (A a T) (Crickmore *et al.* 2018). Los genes *cry8* constan de 3500 pb aproximadamente, coexisten más de uno distinto por cepa y se pueden encontrar juntos también constituyendo islas de patogenicidad dentro de megaplásmidos (Navas *et al.* 2016).

Los genes *cry9* son de los menos estudiados y detectados con menor frecuencia entre aquellos que codifican proteínas tóxicas para lepidópteros (Sauka y Benintende 2008). No obstante, son considerados herramientas muy promisorias para el control eficiente y el manejo de la resistencia de muchas especies de lepidópteros que son importantes desde el punto de vista agronómico (Zhao *et al.* 2001). Existen actualmente 37 genes *cry9* distintos clasificados en 7 clases (A a G) (Crickmore *et al.* 2018), que codifican protoxinas de 130 kDa (Shu *et al.* 2013). Particularmente, proteínas producidas por los genes de las clases *cry9A*, *cry9B*, *cry9C* y *cry9E* se agruparían en inclusiones cristalinas bipiramidales. Por otra parte, los genes *cry9D* lo harían dentro de inclusiones esféricas que no presentarían ninguna relación con las inclusiones bipiramidales y cúbicas típicas de cepas de *B. thuringiensis* tóxicas para lepidópteros (Wasano y Ohba 1998; Wasano *et al.* 2001). Por otra parte, si bien se sabe que los genes *cry1* y *cry2* tienden a hallarse juntos en *B. thuringiensis*, no existiría una asociación clara entre ellos y los genes *cry9* (Sauka y Benintende 2017).

En cuanto a los genes *cry15*, este grupo está formado por sólo un integrante que es el gen *cry15Aa* (Crickmore *et al.* 2018). Este gen codifica para una protoxina de aproximadamente 40 kDa que se agrupa en una inclusión cristalina cuboidal, la cual resulta tóxica para *Manduca sexta* (Brown *et al.* 1992). Es muy poca la información disponible acerca de este grupo. Parecería ser que su presencia se restringe sólo a cepas de *B. thuringiensis* *svar. thompsoni* (Sauka y Benintende 2008).

2.12. Bioinsecticidas y plantas Bt para el manejo de lepidópteros plaga.

En general, los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* incluyen como ingrediente activo en su formulación una mezcla de cristales y esporas. Estos tienen la limitación de que presentan una especificidad restringida a ciertos órdenes de insectos, una potencia relativamente baja y una toxicidad residual corta. A pesar de ello, se han constituido como los agentes de control biológico más populares (Deshayes *et al.* 2017). La cepa *B. thuringiensis* *svar. kurstaki* HD-1 ha sido la más utilizada para el control de insectos lepidópteros que abarcan especies plaga en cultivos agrícolas y forestales (Sauka y Benintende 2008).

Actualmente existen bioinsecticidas de primera, segunda y tercera generación (Sauka *et al.* 2013). Los primeros son aquellos cuya formulación incluyen la mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis*. Constituyen la mayor proporción de los productos comerciales disponibles mundialmente. Los segundos son aquellos constituidos por una mezcla de cristales y esporas de *B. thuringiensis* a la cual se le

introdujo genes de toxinas insecticidas presentes en otros *B. thuringiensis*. Poseen espectro de actividad ampliado o toxicidad incrementada mediante un efecto sinérgico o aditivo. Por último, los bioinsecticidas de tercera generación son aquellos cuya formulación contiene bacterias recombinantes que fueron modificadas genéticamente con genes *cry* de *B. thuringiensis*, o esta misma bacteria modificada con otros genes que codifiquen para otros factores de virulencia distintos a los de toxinas insecticidas. Poseen toxicidad residual aumentada o espectro de actividad ampliado.

Algunos genes codificantes de toxinas Cry de *B. thuringiensis* han sido introducidos mediante ingeniería genética en cultivos o plantas transgénicas (Letourneau *et al.* 2002), proporcionando una forma efectiva de controlar plagas de insectos en la agricultura y reducir el empleo mundial de insecticidas químicos aplicados en el campo (James *et al.* 2010). Este tipo de cultivos o plantas son comúnmente referidas como “cultivos o plantas Bt” (por ejemplo, maíz Bt, algodón Bt, etc.). El primer reporte de una planta transgénica con un gen *cry* de *B. thuringiensis* data de 1987 (Vaech *et al.* 1987).

El empleo de este tipo de plantas presenta una serie de ventajas con respecto a los bioinsecticidas convencionales: reducen la necesidad de aplicación de insecticidas, proveen protección por inactivación de los rayos UV, brindan protección duradera a lo largo de la temporada de cultivo y los únicos insectos expuestos a la toxina son aquellos que se encuentran alimentando de las plantas y no otros insectos (Ahmad *et al.* 2012).

Por otro lado, la gran desventaja de las plantas Bt radica en la posible selección de poblaciones naturales de insectos resistentes que se alimentan de ellas (Tabashnik *et al.* 2013). La primera planta Bt se registró en nuestro país en 1998. La misma es un maíz que expresa Cry1Ab y fue pensada para el control de lepidópteros plaga. Desde ese entonces, unos 19 eventos diferentes de maíz Bt, tres de soja Bt y dos de algodón Bt para el manejo de distintos lepidópteros y coleópteros, se han aprobado para su cultivo y comercialización (Argenbio 2017).

3. *Cydia pomonella*: plaga principal de frutales de pepita.

3.1. *Cydia pomonella*.

La “Carpocapsa” o “polilla de la pera y la manzana”, *Cydia pomonella* L. [Lepidoptera: Tortricidae], no solo es una de las plagas principales de los cultivos de peras y manzanas, sino que lo es de otros frutales de pepita como los membrillos, y también nogales de todo el mundo (Bloem *et al.* 1998). Es un insecto cosmopolita presente prácticamente en todos los lugares donde se cultivan sus huéspedes.

La presencia de *C. pomonella* se ha registrado en nuestro país a partir de la década del cincuenta. Posteriormente, en 1964 fue declarada plaga nacional de la agricultura (por disposición N° 116/64 de la Dirección de Lucha Contra las Plagas de la Secretaría de Agricultura y Ganadería).

Este insecto fue descrito por Linnaeus en 1758. Desde su descripción original con el nombre de *Phalaena Tinea pomonella* de Linnaeus en 1758, pasando por *Laspeyresia pomonana* Hubner en 1825, *Carpocapsa pomonana* Treitschke en 1830 y *Carpocapsa pomonella* Harris en 1862, hasta la actualidad que la conocemos con el nombre de *Cydia pomonella* impuesto por Walsingham en 1897 (Brown 1979).

3.2. Biología y comportamiento.

La biología de *C. pomonella*, como la de todos los animales de sangre fría, está regulada por la temperatura y el fotoperíodo. Es así como, dependiendo de las condiciones climáticas, puede tener tres generaciones y excepcionalmente una cuarta (especie polivoltina). *Cydia pomonella* pasa el invierno en diapausa, como larva de último estadio, protegida dentro de gruesos capullos debajo de la corteza, en el suelo, en grietas de postes y puntales, en las maderas de cajones, en bolsas de arpillera, en restos de fruta, en quebraderos de nuez o incluso en las paredes de los edificios utilizados para el empaque y almacenamiento. Entre fines de agosto y principios de septiembre, con el incremento de la temperatura, las larvas reanudan su desarrollo para transformarse en pupa y luego en adultos que darán origen a la primera generación. Los adultos aparecen en la primavera y los primeros individuos en aparecer son los machos. El vuelo de las hembras ocurre una o dos semanas después y representan el vuelo de la tercera generación del año anterior (SENASA 2017).

Cydia pomonella es un insecto de metamorfosis completa que atraviesa en su vida por cuatro estados de desarrollo:

- Huevo (Fig. 1.6A): es de forma oval, blanco-perlado, aplanado en los bordes y algo elevado en el centro. Tiene un tamaño aproximado de 1,2 a 1,3 mm de diámetro. Al momento de la oviposición, el interior del huevo es opaco. A los 3 ó 4 días, comienza la formación de distintas capas internas del embrión y aparece una aureola roja que recorre toda la circunferencia del huevo. Por último, empiezan a ser visibles las partes esclerotizadas del embrión, especialmente la cabeza.
- Larva (Fig. 1.6A): la larva recién eclosionada es de color blanco cremoso con la cápsula cefálica negra y de 1,8 a 2 mm de largo. Durante el ciclo de desarrollo pasa por cinco estadios larvales separados uno del otro por un cambio del tegumento (muda), antes de transformarse en pupa. El largo total del cuerpo alcanzado por el quinto estadio larval es de 14 a 18 mm y tiene un color rosa pálido, con la cápsula cefálica negra o marrón (Fig. 1.6B).
- Pupa (Fig. 1.6C): es de color marrón con bordes y espinas negras. El tamaño de la pupa varía entre 8 y 11 mm. En este estado, el sexo se diferencia por los últimos segmentos del abdomen. En la hembra se observan ventralmente dos depresiones genitales en los dos últimos segmentos, que no se observan en el macho.
- Adulto (Fig. 1.6D): son típicas polillas de color gris, de 8 a 10 mm de largo. Las alas posteriores en reposo caen en forma de techo a dos aguas. Los ojos compuestos son grandes y esféricos, y las antenas, filiformes. El abdomen tiene diez segmentos, que entre el octavo y el noveno, la hembra posee una glándula para la liberación de feromonas. El extremo del abdomen de la hembra posee una papila anal, circular, de color marrón y un punto oscuro sobre ésta, que es el orificio de cópula. El macho presenta un extremo abdominal cerrado, con un par de valvas que utiliza para sujetar a la hembra durante la cópula (Cichón y Fernández 2003; Quintana y Cólica 2011).



Fig. 1.6. Estados de desarrollo de *Cydia pomonella*. (A): huevos depositados sobre hojas y larva. (B): larvas de 5to estadio. (C): pupa. (D): adulto de color gris con alas en reposo. Tomadas de <http://www.fomesafruitech.net/>.

Cuando el macho y la hembra adulta maduran sexualmente se produce la cópula. La hembra fecundada ovipone en la superficie del fruto o en hojas en donde deposita los huevos, las larvas eclosionadas de estos huevos, buscan los frutos y en cuestión de unas pocas horas perforan la epidermis y penetran en el fruto. Luego de atravesar esta capa del fruto, la larva construye una cámara en espiral donde muda del primero al segundo estadio. Seguidamente, desarrolla una galería en la pulpa que generalmente se dirige en forma recta hacia las semillas, en el corazón del fruto, lo que implica un daño estético y de calidad que impide la comercialización en fresco de la fruta afectada (Fig. 1.7), provocando pérdidas económicas tanto en la etapa de producción como en el almacenamiento (Bloem *et al.* 1998). La entrada en el fruto se puede producir por distintos lugares de su superficie, por la zona peduncular o por la zona calicinal (Fig. 1.7). Una vez que las larvas alcanzan la semilla, se alimentan de su contenido rico en hidratos de carbono y lípidos. Luego de 20 a 30 días de desarrollo en el interior del fruto, la larva madura abandona el fruto por el mismo orificio de entrada. Una vez fuera del fruto, la larva llega al quinto estadio larval teje un capullo de seda en un lugar protegido del tronco del árbol, encontrándose lista para pasar al siguiente estado de pupa durante el cual se formara su nuevo cuerpo de adulto. Posteriormente, emergen los adultos que iniciarán un nuevo ciclo (Chichón y Fernández 2003; Giganti *et al.* 2007).



Fig. 1.7. Ingreso de *Cydia pomonella* en manzanas. (A): Manzana con dos orificios de penetración. (B): Larva del último estadio y galería. Adaptado de Bosch *et al.* 2008.

Objetivos e Hipótesis

Objetivo general:

Selección de cepas e identificación de proteínas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades insecticidas que sean altamente específicas y eficientes para el control de *Cydia pomonella*, con la finalidad de aportar información relevante para mejorar estrategias y herramientas de control existentes, destinadas al manejo de este lepidóptero.

Objetivos específicos:

- Clonado y expresión individual de proteínas Cry en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis*.
- Evaluación de la toxicidad de proteínas individuales Cry de *B. thuringiensis* en larvas de *C. pomonella*.
- Evaluación de la toxicidad de diferentes mezclas de proteínas Cry y análisis de interacciones entre ellas.
- Estudio de la prospección de la biodiversidad natural de *B. thuringiensis* en larvas vivas y sanas de *C. pomonella*, y su caracterización fenotípica y genotípica.
- Selección de las cepas nativas que contengan representantes de las proteínas insecticidas más activas, caracterización fenotípica y genotípica y determinación de su toxicidad.
- Realización de un análisis exploratorio de las variables que influyen en la producción de proteínas insecticidas de una cepa seleccionada en medio de cultivo líquido.

Hipótesis general:

Es posible seleccionar cepas e identificar proteínas de *Bacillus thuringiensis* con propiedades insecticidas con alta especificidad y eficientes para el control de *Cydia pomonella*. Esto permitirá disponer de información relevante para mejorar estrategias y herramientas de control existentes destinadas al manejo de esta plaga.

Hipótesis específicas:

- Existen proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* que son tóxicas para larvas de una población nativa de *C. pomonella*.
- Las larvas de estos insectos son más susceptibles a ciertas proteínas insecticidas que a otras.
- Determinadas mezclas de proteínas insecticidas son más tóxicas que sus componentes individuales, mientras que otras no, por lo que su uso combinado como estrategia de control debería evitarse.
- Es factible aislar nuevas cepas de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas *C. pomonella* provenientes de zonas de producción.
- Existen cepas de *B. thuringiensis* en la colección del IMYZA-INTA que producen combinaciones de proteínas insecticidas eficientes y específicas para el control de la plaga en estudio.
- Los componentes de un medio de cultivo líquido influyen en la producción de proteínas insecticidas de una cepa de *B. thuringiensis* en particular.

Capítulo 2:

Materiales y Métodos

Capítulo 2: Materiales y Métodos

1. Cepas de *Bacillus thuringiensis* empleadas.

En este trabajo se emplearon 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 81 cepas nativas diferentes, obtenidas de muestras de suelo, residuos de molienda de granos, filoplano de plantas, telarañas y larvas de insectos, de diferentes regiones de Argentina (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en diferentes etapas de estudio.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Origen	Provincia	Invertebrado¹	Sección²
INTA 3-1	Suelo	Entre Ríos	L y D	3
INTA 7-3	Suelo	Buenos Aires	L y D	3
INTA 50-4	Suelo	Jujuy	L y D	3
INTA 54-8	Suelo	Salta	L y D	3
INTA 56-4	Suelo	Salta	L y D	3
INTA 77-10	Suelo	Entre Ríos	Ni en L, D, C o Ne	3
INTA 78-2	Suelo	Buenos Aires	L y D	3
INTA 79-37	Suelo	Buenos Aires	L y D	3
INTA 79-38	Suelo	Buenos Aires	L y D	3
INTA L1-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTA L2-1	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTA L14-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTA L93-3	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTAL276-1	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L276-5	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L276-9	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L276-10	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L276-11	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L277-5	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L277-10	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA L280-4	Larva de insecto	Mendoza	-	2
INTA Ep-2	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTA VO3	Larva de insecto	Santa Fe	L y D	3
INTA Mo1-7	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo1-10	Molienda de granos	Buenos Aires	L	3
INTA Mo1-12	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo4-6	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo5-8	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo8-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo8-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo9-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo9-5	Molienda de granos	Buenos Aires	L	3
INTA Mo14-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3

INTA Mo14-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo14-3	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo15-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo17-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo22-4	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo23-2	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo26-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo27-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo28-4	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Mo29-1	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3
INTA Fo3-2	Suelo	Entre Ríos	L y D	3
INTA Fr7-4	Suelo	Misiones	L y C	2 y 3
INTA TA1-11	Telaraña	Buenos Aires	L y D	3
INTA TA1-13	Telaraña	Buenos Aires	L y D	3
INTA TA20-6	Telaraña	Entre Ríos	L y D	3
INTA TA21-2	Telaraña	Entre Ríos	L y D	1 y 3
INTA TA24-2	Telaraña	Entre Ríos	L y D	3
INTA TA24-6	Telaraña	Entre Ríos	L	1 y 3
INTA TA24-10	Telaraña	Entre Ríos	L y D	3
INTA H1-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H1-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H2-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H2-12	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H3-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H3-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H3-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H4-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H4-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1 y 3
INTA H5-2	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H5-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H6-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H7-3	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H11-4	Filoplano	Buenos Aires	Ni en L, D, C o Ne	3
INTA H12-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H13-5	Filoplano	Tucumán	L	3
INTA H14-1	Filoplano	Tucumán	L y D	3
INTA H17-5	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H22-2	Filoplano	Buenos Aires	Ni en L o D	3
INTA H42-1	Filoplano	Buenos Aires	L y D	1 y 3
INTA H45-4	Filoplano	Buenos Aires	L y D	3
INTA H46-12	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA H46-18	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA H47-2	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA H48-5	Filoplano	Entre Ríos	L, D y Ne	1, 2 y 3
INTA H48-6	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA H48-34	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA H48-8	Filoplano	Entre Ríos	L y D	3
INTA Pol49-6	Molienda de granos	Buenos Aires	L y D	3

¹Invertebrado blanco con susceptibilidad probada en *B. thuringiensis*. L: *Anticarsia gemmatilis* H. (Lepidoptera: Noctuidae) y/o *Crociosema aporema* W. (Lepidoptera: Tortricidae); D: *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae); C: *Epilachna paenulata* G. (Coleoptera: Coccinellidae); Ne: *Panagrellus redivivus* G. (Nematoda: Panagrolaimidae). ² Sección o secciones en las cuales la cepa es estudiada.

Por otra parte, se utilizaron también 16 cepas pertenecientes a distintos serovares de *B. thuringiensis* provenientes de colecciones internacionales (Cuadro 2.2).

Cuadro 2.2. Cepas exóticas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en diferentes etapas del estudio.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Origen ¹	Sección ²
svar. <i>aizawai</i> HD-133	USDA	3
svar. <i>aizawai</i> HD-137	USDA	3
svar. <i>entomocidus</i> HD-110	BGSC	3
svar. <i>galleriae</i> T05001	IP	3
svar. <i>indiana</i> HD-521	USDA	2
svar. <i>israelensis</i> 4Q7	CINVESTAV	1
svar. <i>israelensis</i> HD-567	USDA	2 y 3
svar. <i>israelensis</i> IPS82	CINVESTAV	2 y 3
svar. <i>kumamotoensis</i> HD-867	USDA	3
svar. <i>kurstaki</i> HD-1	USDA	1, 2 y 3
svar. <i>kurstaki</i> HD-73	USDA	1 y 3
svar. <i>morrisoni tenebrionis</i> DSM2803	CINVESTAV	2 y 3
svar. <i>thompsoni</i> HD-542	USDA	3
svar. <i>thuringiensis</i> HD-2	USDA	2 y 3
svar. <i>tochigiensis</i> HD-868	USDA	3
svar. <i>tolworthi</i> HD-125	USDA	3

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

2. Preparación de las cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en diversos 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; KH₂PO₄, 1 g; K₂HPO₄, 2,5 g; MgSO₄·7H₂O, 0,25 g; MnSO₄·H₂O, 0,2 g; glucosa, 5 g; almidón, 2,5 g; extracto de levadura (Oxoid), 4 g; agua destilada c.s.p 1 litro). Para el cultivo de clones recombinantes de *B. thuringiensis* transformados con genes de toxinas insecticidas el caldo fue suplementado con cloranfenicol (7 µg/ml). Se ajustó el pH a 7,1-7,2 con NaOH, a 250 rpm (Thermo scientific Sorvall RC 6+) y 29 °C durante 72 h o hasta autólisis. Las distintas fracciones de los cultivos completos (*pellet* y sobrenadante) se obtuvieron mediante centrifugación a 10.000 rpm (Thermo scientific Sorvall RC 6+) a 4 °C durante 20 min. El sobrenadante fue separado y al *pellet* se le realizaron tres lavados por centrifugación con agua desionizada estéril. El mismo se dejó secar en una estufa de circulación forzada (San Jor H701P) a 30 °C durante 96 h y cuando estuvo seco, se procedió a molerlo homogéneamente en un mortero. Finalmente se conservó en freezer a -20 °C hasta su uso.

3. Ensayos biológicos de toxicidad.

3.1. Bioensayos de *Bacillus thuringiensis* con *Cydia pomonella*.

La acción de *B. thuringiensis* sobre insectos susceptibles requiere de metodologías de evaluación que se llevan a cabo a diferentes niveles. Los bioensayos de *B. thuringiensis* realizados con *Cydia pomonella* se dividieron en “burdos” y “finos”. Los primeros se realizaron para evaluar la patogenicidad de clones recombinantes de *B. thuringiensis* y de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de *C. pomonella*, y para llevar a cabo un tamizaje en búsqueda de las cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* más tóxicas. En los segundos se evaluaron proteínas Cry individuales y mezclas de ellas, cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* seleccionadas, y bioinsecticidas comerciales conteniendo a *B. thuringiensis* como ingrediente activo, así como el efecto de la solubilización y tripsinización *in vitro* de cristales. En cada caso se determinó la actividad tóxica a través de la estimación de la concentración letal media (concentración que produce el 50% de mortalidad de la población de insectos bajo ensayo). Todos los bioensayos se realizaron por el método de incorporación en dieta utilizando placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc 143982). Las larvas de *C. pomonella* empleadas fueron provistas por el Laboratorio de Cría de Insectos II (IMYZA-INTA).

3.1.1. Bioensayos “burdos” con *Cydia pomonella*.

El procedimiento para llevarlos a cabo fue el siguiente:

- 1) se preparó la dieta larval para *C. pomonella* (harina de maíz, 40 g; germen de trigo, 50 g; levadura de cerveza en polvo (Calsa), 50 g; leche en polvo descremada (Sancor), 12 g; agar-agar (Oxoid), 12 g; agua desionizada c.s.p. 1 litro). Esta preparación se esterilizó por calor húmedo a presión superior a la normal en autoclave (121 °C durante 15 min). Luego se mantuvo la dieta en baño de agua a 55 °C. A continuación se agregaron distintas sustancias como conservantes: ácido ascórbico, 3 g/l; ácido sórbico, 1,5 g/l; nipagín, 2,5 g/l;
- 2) se utilizaron suspensiones de *pellet* seco y molido homogeneizado en una concentración final de 1000 µg/ml (sección 1 - “Resultados y Discusión”) y de 5 µg/ml de dieta (sección 2 y 3 - “Resultados y Discusión”) del complejo espora-cristal del clon recombinante o de la cepa de *B. thuringiensis* a ensayar. La suspensión se homogeneizó en 19 ml de la dieta artificial termostatzada contenida en tubos cónicos de 50 ml;
- 3) como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 (sección 2 - Resultados y Discusión), como control negativo el clon recombinante pSVP27-4Q7 que contiene el vector sin inserto (sección 1 - Resultados y Discusión) y como testigo se agregó agua desionizada estéril en todos los ensayos (control de mortalidad natural);
- 4) se fraccionaron 400 µl de las mezclas en cada pocillo de las placas. Se colocó una larva neonata de *C. pomonella* con la ayuda de un pincel en cada uno de ellos. Se emplearon 24 larvas por cada tratamiento y se realizaron al menos dos repeticiones de cada uno;
- 5) la mortalidad se registró luego de ser incubados a 29 °C durante 5 d, y los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 3.1). Los ensayos donde la mortalidad natural de los individuos superó el 10% fueron descartados.

3.1.2. Bioensayos “finos” con *Cydia pomonella*.

La virulencia de proteínas Cry individuales y en mezclas, de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* seleccionadas, de bioinsecticidas comerciales conteniendo a *B. thuringiensis* como ingrediente activo, y el efecto de la solubilización (Na_2CO_3 50 mM pH 10,6) y tripsinización *in vitro* de proteínas que constituyen cristales (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 (CL_{50}) utilizando la metodología de incorporación en dieta. El procedimiento empleado fue similar a lo detallado en el ítem 3.1.1.

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 concentraciones finales específicas. La mortalidad se registró luego de incubar el ensayo a 29 °C durante 5 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 dos ensayos independientes realizados en días diferentes se consideraron para establecer el valor definitivo de CL_{50} . Los ensayos donde la mortalidad natural de los individuos superó el 10% fueron descartados.

La comparación entre los distintos tratamientos fue analizado estadísticamente utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 3.1).

3.2. Bioensayos “burdos” con *Alphitobius diaperinus*.

Se realizaron bioensayos “burdos” de aislamientos nativos nuevos de *B. thuringiensis* con *Alphitobius diaperinus* P. (Coleoptera: Tenebrionidae) por el método de incorporación en dieta utilizando placas de poliestireno de 24 pocillos (Nunc 143982), con el objeto de determinar su toxicidad para coleópteros. Las larvas de *A. diaperinus* se obtuvieron a partir de una cría artificial mantenida en nuestro laboratorio.

El procedimiento para llevarlos a cabo fue el siguiente:

- 1) se preparó la dieta larval para *A. diaperinus* (alimento balanceado para pollo (Ganave), 133,3 g; agar-agar (Oxoid), 10 g; agua desionizada c.s.p. 1 litro). Esta preparación se esterilizó por calor húmedo a presión superior a la normal en autoclave (121 °C durante 15 min). Luego se mantuvo la dieta en baño de agua a 55 °C. A continuación se agregaron distintas sustancias como conservantes: ácido ascórbico, 3 g/l; ácido sórbico, 1,5 g/l; nipagín, 2,5 g/l;
- 2) se utilizaron 6 ml de un cultivo completo en caldo BM de cada aislamiento de *B. thuringiensis* a ensayar obtenidos en las condiciones detalladas en el ítem 2. Las preparaciones se incorporaron a tubos cónicos de 50 ml con 34 ml de dieta artificial termostatzada;
- 3) como control positivo se utilizó a *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803. Se utilizó caldo BM estéril en los controles de mortalidad natural;
- 4) se fraccionaron 400 µl de las mezclas en cada pocillo de las placas. Se colocó una larva 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 dos repeticiones de cada tratamiento;

5) la mortalidad se registró luego de ser incubados a 29 °C durante 15 d. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 3.1). Se descartaron los ensayos donde la mortalidad natural de los individuos superó el 10%.

3.3. Bioensayos “burdos” con *Aedes aegypti*.

Se realizaron bioensayos “burdos” de clones recombinantes transformados con *cry2* y aislamientos nativos nuevos de *B. thuringiensis* con *A. aegypti* con el objeto de determinar su toxicidad para dípteros. Las larvas de *A. aegypti* se obtuvieron a partir de huevos provistos por el Dr. Juan José García (Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores, CONICET-UNLP).

El procedimiento para llevarlos a cabo fue el siguiente:

- 1) los bioensayos fueron realizados en vasos plásticos (de 500 ml) conteniendo 100 ml de agua potable declorada para cada tratamiento y 20 larvas de cuarto estadio temprano de *A. aegypti*;
- 2) a cada vaso se le agregó una suspensión de *pellet* seco y molido en una concentración de 100 µg/ml. A los testigos sólo se les adicionó agua desionizada estéril;
- 3) como control positivo se utilizó la cepa *B. thuringiensis* svar. *israelensis* HD-567 y como control de mortalidad natural solo agua potable declorada. Se realizaron dos repeticiones de cada tratamiento;
- 4) la mortalidad se registró luego de ser incubados a 29 °C por 24 h. Los resultados se analizaron utilizando el programa GraphPad InStat (GraphPad Software Inc., 3.1). Se descartaron los ensayos donde la mortalidad natural de los individuos superó el 10%.

4. Detección y caracterización morfológica de los cristales.

Con el objeto de detectar y caracterizar la morfología de los cristales presentes en clones recombinantes transformados con genes de toxinas insecticidas y en cepas de *B. thuringiensis*, se procedió a analizar su *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).

5. Materiales y metodologías para el análisis de proteínas.

5.1. Electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Los componentes proteicos de los cristales presentes en clones recombinantes transformados con genes de toxinas insecticidas y en cepas de *B. thuringiensis* fueron analizados mediante electroforesis en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE), de acuerdo a la técnica descripta por Sambrook *et al.* (1989). La mezcla de reacción se presenta en el cuadro 2.3.

Los *pellet* resuspendidos de clones recombinantes transformados con genes de toxinas insecticidas y de las cepas de *B. thuringiensis* en estudio se mezclaron en relación 1:1 con el buffer de desnaturalización 2x (Tris-HCl 25 mM pH 6,8; β-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

2,30 h, utilizando buffer de corrida 1x (Tris 0,05 M; glicina 0,38 M; SDS 0,02%; pH 8,8).

Cuadro 2.3. Mezcla de reacción para geles desnaturalizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE).

Reactivos	Gel de concentración (5%) (µl)	Gel de separación (10%) (µl)
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

Finalizada la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul brillante de Coomassie 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).

5.2. Solubilización y tripsinización de cristales.

Los *pellet* secos y molidos de clones recombinantes transformados con genes de toxinas insecticidas y de distintas cepas de *B. thuringiensis* en estudio se solubilizaron a 37 °C durante 30 min a razón de 1 mg por ml de una solución de Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,6. Después del período de incubación las suspensiones fueron centrifugadas durante 1 min a 13.000 rpm (Sigma 1-15 pk), y el material insoluble separado. Particularmente para el caso de las cepas INTA H12-5 e INTA H42-1, 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), a 37 °C durante 2 h, para ser utilizadas en el ítem 3.3.2. - “Resultados y Discusión”.

Las condiciones de solubilización optimizadas en este ítem se emplearon para obtener las preparaciones que se ensayaron en la cuantificación de proteínas (ver ítem 5.3) y en bioensayos “finos” (ver ítem 3.1.2.), con excepción de los realizados en el Cuadro 3.13 – Sección 3.

5.3. Cuantificación de proteínas totales por el método de Bradford (Bradford, 1976).

La cuantificación de proteínas se realizó a partir de muestras de *pellet* seco y molido solubilizados en condiciones alcalinas (ver ítem 5.2.).

- 1) Se prepararon distintas concentraciones de seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma), entre 200 a 600 µg/ml y varias diluciones de las muestras a cuantificar;
- 2) se tomaron 25 µl de cada solución estándar o muestra y se le agregó 1,25 ml del reactivo de Bradford (“Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent Concentrate”);
- 3) estas mezclas se homogenizaron por inversión y se incubaron a temperatura ambiente durante 5 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. Materiales y metodologías para el análisis de ácidos nucleicos.

6.1. Extracción de DNA total de *Bacillus thuringiensis*.

6.1.1. Método de hervor simple.

Los clones recombinantes transformados con genes de toxinas insecticidas y cepas de *B. thuringiensis* en estudio fueron cultivadas en agar nutritivo (Difco) a 29 °C durante 16 h, con y sin el suplemento de cloranfenicol (7 µg/ml) respectivamente. Se transfirió un asa cubierta de células a un tubo eppendorf conteniendo 100 µl de agua desionizada estéril y se colocó en un baño seco a 95 °C durante 10 min para romper las células y liberar el DNA. Este lisado se centrifugó durante 2 min a 13.000 rpm (Sigma 1-15pk). Cinco µl del sobrenadante se utilizaron como molde de DNA por tubo de reacción de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (ver ítem 6.3).

6.1.2. Método de extracción por kit comercial.

Se empleó el kit comercial “Wizard Genomic DNA Purification Kit” (Promega) para la obtención del DNA que se empleó como molde para reacciones de *hot start* PCR y Rep-PCR (ver ítem 6.3). Los pasos a seguir fueron los siguientes:

- 1) de una placa de agar nutritivo (Difco) incubada a 29 °C durante 16 h se tomó una colonia y se la sembró en 5 ml de caldo LB (Becton Dickinson) (DO a 600nm, 1);
- 2) se tomó 1 ml del cultivo fresco y se centrifugó a 11.000 rpm (Sigma 1-15pk) a 4 °C durante 2 min;
- 3) el *pellet* se resuspendió en 480 µl de EDTA 50mM;
- 4) se agregaron 120 µl de lisozima (5 mg/ml) y se incubó durante 1 h a 37 °C. Luego, se centrifugó durante 2 min a 11.000 rpm (Sigma 1-15pk);
- 5) se agregaron 600 µl de solución de lisis y se incubó por 5 min 80 °C;
- 6) a continuación se agregaron 3 µl de RNAasa y se incubó por 1 h a 37 °C;
- 7) se agregaron 200 µl de solución de precipitación de proteínas y se incubó en baño de hielo por 5 min. Se centrifugó durante 3 min a 11.000 rpm (Sigma 1-15pk);
- 8) el sobrenadante se trasvasó a un tubo eppendorf conteniendo 600 µl de isopropanol para precipitar el DNA. Se centrifugó durante 4 min a 11.000 rpm (Sigma 1-15pk) y se descartó el sobrenadante;
- 9) el *pellet* se lavó con 600 µl etanol 70 ° y se centrifugó nuevamente durante 4 min a 11.000 rpm (Sigma 1-15pk);
- 10) se aspiró el etanol y se dejó secar el sedimento al aire libre durante 15 min. Al DNA extraído se le agregaron 50 µl de solución rehidratante y se incubó por 1 h a 65 °C;
- 11) finalmente se almacenó a -20 °C hasta su uso.

6.2. Extracción de DNA plasmídico.

Los plásmidos de las cepas seleccionadas por su toxicidad para *C. pomonella*, 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 ((NH₄)₂SO₄, 2 g; KH₂PO₄, 6 g; K₂HPO₄, 14 g; MgSO₄·7H₂O, 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 en agitación a 340 rpm y 30 °C durante 12 h hasta obtener un DO (600 nm) de 1,0;
- 2) se centrifugó por 10 min a 6.000 rpm (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 µl/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 13.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) y 4°C durante 15 min y se colocó el sobrenadante en un tubo nuevo con 2 volúmenes de etanol absoluto frío para precipitar el DNAp (DNA plasmídico). Se incubó en estas condiciones a -70 °C durante 30 min;
- 7) se centrifugó a 13.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) y 4 °C durante 15 min. Se desechó el sobrenadante y se lavó el *pellet* con 150 µl de etanol absoluto frío. Se centrifugó nuevamente a 13.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+) y 4°C durante 5 min y se descartó el sobrenadante. Se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 30 min, donde queda el DNAp;
- 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 10.000 rpm (Sigma 1-15pk) durante 5 min a 20 °C y se descartó la fase orgánica;
- 9) se realizó otra extracción con un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico, homogenizando suavemente. Se centrifugó a 10.000 rpm (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 DNAp se lavó con 2 volúmenes de etanol 70% frío y se centrifugó a 10.000 rpm (Sigma 1-15pk) y 20 °C durante 5 min. Se dejó secar el *pellet* a temperatura ambiente durante 30 min;
- 12) éste 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.

6.3. Amplificación génica mediante PCR (*Polymerase Chain Reaction*).

El método de “hot start” PCR se utilizó para la amplificación del marco de lectura abierto completo de los genes *cry* que fueron clonados en una cepa de *B. thuringiensis* acristalífera. La metodología clásica de PCR se utilizó para la selección de colonias de *Escherichia coli* y *B. thuringiensis* transformadas con genes *cry1A* y *cry2A*, y para confirmar la identidad de dichos genes de toxinas insecticidas (ver ítem 7). Por otro lado, la metodología clásica de PCR y variantes se utilizaron para la detección de la presencia de genes que codifican proteínas principalmente tóxicas para insectos pertenecientes a los órdenes Lepidoptera (*cry1*, *cry2* y *vip3A*), Coleoptera (*cry3*, *cry8*, *cry23*, *cry37*, *vip1* y *vip2*), y Diptera (*cry4*, *cyt1* y *cyt2*), del gen *thuE* asociado a la síntesis de β -exotoxina de tipo I y del gen *zmaA*, que forma parte de un *cluster* de genes asociados a la producción de zwittermicina A, en aislamientos nativos nuevos de *B. thuringiensis* obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de *C. pomonella*. Además, se utilizó una Rep-PCR (*Repetitive Extragenic Palindromic Sequence-PCR*) específica para bacterias del grupo *B. cereus*, en los aislamientos nativos nuevos y en las cepas nativas más tóxicas para *C. pomonella*, para su tipificación y establecimiento de relaciones de parentesco.

6.3.1. Mezcla de reacciones.

En el cuadro 2.4 se muestra el protocolo utilizado para todas las reacciones, con adaptaciones según el caso.

Cuadro 2.4. Mezclas de reacciones para PCR.

Reactivos	Volumen (μl)	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 ¹ (10 μM)	0,8-5,5	0,32-2,20 μM
Cebador R ² (10 μM)	0,8-6,9	0,32-2,20 μM
MgCl ₂ (25mM)	1,0-4,0	1-4 mM
Taq DNA polimerasa (5U/μl) ³	0,2-1,0	1,0-5,0 U

¹ D, directo; ² R, reverso; ³ enzima *T-plus DNA polimerasa* (Inbio Highway).

6.3.2. Parámetros de las reacciones.

Los ciclos de todas las reacciones se realizaron en un termociclador IVEMA T-18 (Cuadro 2.5).

Cuadro 2.5. Parámetros generales de reacciones de PCR.

Temperatura (°C)	Etapas	Tiempo (min)
94	desnaturalización inicial	1 a 5
	25 a 34 ciclos	
94	desnaturalización	1 a 2
*	<i>annealing</i>	0,75 a 1
72	elongación	0,75 a 4
72	elongación final	5 a 10

*Las temperaturas de *annealing* de los distintos cebadores se encuentran en el cuadro 2.6.

6.3.3. Cebadores.

Los cebadores utilizados para las reacciones de amplificación de PCR de fragmentos de genes que codifican proteínas lepidopteridas, coleopteridas, dipteridas, del gen *thuE*, del gen *zmaA* y de la Rep-PCR se encuentran descritos en el cuadro 2.6.

Cuadro 2.6. Cebadores utilizados en este estudio.

Nombre	Gen blanco	Cebador (secuencia 5'-3') ¹	Ta ²	Fragmento esperado	Referencia
I(+) I(-)	<i>cry1</i>	TRACRHTDDBDGTATTAGAT MDATYTCTAKRTCTTGACTA	45	ca. 1,5 kb	Juárez-Pérez <i>et al.</i> 1997
II(+) II(-)	<i>cry2</i>	TAAAGAAAGTGGGGAGTCTT AACTCCATCGTTATTTGTAG	45	ca. 1,5 kb	Masson <i>et al.</i> 1998
DS3AF DS3AR	<i>vip3A</i>	GTGAAAACAAGTGGCAGTG TCCGCTTCACTTGATTCTACT	48	608 pb	Sauka <i>et al.</i> 2012
S3F S3R	<i>cry3</i>	TGAATCCRAACAATGAAGTG GTAAAWGTCATYTCTCTGCGA	49	ca. 820 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
S7F S7R	<i>cry7</i>	TAGGTGTCCCAGTGCAAG GCCGCTTGTGCGTAAACT G	54	358 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
S8F S8R	<i>cry8</i>	GAATGCCTATCSGATGA CCABGCTTGTTGGAGTC	46	ca. 930 pb	Sauka <i>et al.</i> 2017
S23F S23R	<i>cry23</i>	AAAGCACATACGATCCCTCA CATTTGGTGCTAATGAACCAT	49	702 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
S37F S37R	<i>cry37</i>	CGCAACTTTTCACCATTAATTT C GAACCTTTCTCATCGCCATC	49	330 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
Vip1F Vip1R	<i>vip1</i>	TGGATTGGWTTGATTCARAG TARGGATCTCCAACGTGRTG	49	ca. 530 pb	Onco 2012
Vip2R Vip2F	<i>vip2</i>	TGGAAAYTAACYGYTACTG GATAACCAAATTCYGSCAT	49	826 pb	Onco 2012
4AF 4ABR	<i>cry4A</i>	TCGTTCCGATGTATATACAAACAC CGGCTTGATCTATGTCATAATCTG	52	194 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
4BF 4ABR	<i>cry4B</i>	GATGCAATTGTACCGATGAGATTATC CGGCTTGATCTATGTCATAATCTG	52	250 pb	Sauka <i>et al.</i> no publicado
Cyt1F Cyt1R	<i>cyt1</i>	CAATCAACAGCAAGRGTATT GRATTGCAAACAGGACATTRTA	46	ca. 470 pb	Sauka y Benintende 2012
Cyt2F Cyt2R	<i>cyt2</i>	CAAATTGCAAATGGTMTTCC AACATCYACAGTAATYTCAAATGC	46	340 pb	Sauka y Benintende

						2012
BEF1 BER1	<i>thuE</i>	GCGGCAGCCGTTTATTCAAA CCCCTTCCCATGGAGAAACA	54	384 pb	Sauka <i>et al.</i> 2014	
BEF2 BER2	<i>thuE</i>	CAGTAAAAGGCCCATTTGGAA TTCCATGAATTTGCCGATTT	54	406 pb	Sauka <i>et al.</i> 2014	
REP-1 REP-2	*	ATTAAAGTTTCACTTTAT TTAAATCAGTGGGG	42	³	Reyes- Ramírez e Ibarra 2005	
B-K1/F B-K1/R1	<i>16S</i> <i>rDNA</i>	TCACCAAGGCRACGATGCG CGTATTCACCGCGGCATG	63	ca. 1100 pb	Wu <i>et al.</i> 2006	
ZAF ZAR	<i>zmaA</i>	TGAGTGGTTCTATACTCCAGG AGTGTCAATAATGTCCGTTTG	53	602 pb	Sauka <i>et al.</i> 2015	
ZCF ZCR	<i>zmaC</i>	TGAATCTATGAAGACAGCAGC CTGCCACTCAAACGTGTCT	53	700 pb	Sauka <i>et al.</i> 2015	
1Ac-N- BamH1	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> y	CGGGATCCATGGATAACAATCCGAA CATCAATG ⁴	55	ca. 3500 pb	Este estudio	
1Ac-C- SphI	<i>cry1Ac</i>	ACATGCATGCCTATTCCTCCATAAG GAGTAATTCCC				
2Aa-N- BamH1	<i>cry2Aa</i> y <i>cry2Ab</i>	CGGGATCCATGAATARTGTATTGAAT AGTGGAAGAAC	55	1902 pb	Este estudio	
2Aa-C- SphI		ACATGCATGCTTAATAAAGTGGGTG RAAKATTAGTTG				
pSVP27F pSVP27R	vector de clonado	AACATGCACCAATGTATACA AGTCATAAAACCACTCCTTT	55	400 pb ⁵	Berretta <i>et al.</i> no publicado	
1Ab I (-)	<i>cry1Ab</i>	CGGATGCTCATAGAGGAGAA MDATYTCTAKRTCTTGACTA	45	1400 pb	Juárez-Pérez <i>et al.</i> 1997	
CJ1 CJ2	<i>cry1Aa</i>	TTATACTTGTTTCAGGCCC TTGGAGCTCTCAAGGTGTAA	53	246 pb	Cerón <i>et al.</i> 1994	
CJ4 CJ5	<i>cry1Ab</i> y <i>cry1Ac</i>	AACAACCTATCTGTTCTTGAC CTCTTATTATACTTACACTAC	53	216 pb	Cerón <i>et al.</i> 1994	
CJ6 CJ7	<i>cry1Ac</i>	GTTAGATTAAATAGTAGTGG TG TAGCTGGTACTGTATTG	53	180 pb	Cerón <i>et al.</i> 1994	

¹ Código universal para bases degeneradas: W, A/T; R, A/G; Y, C/T; S, G/C. ²Ta, temperatura de *annealing*. ³El blanco de estos cebadores son fragmentos repetitivos que se encuentran a lo largo del genoma de *B. thuringiensis*. ⁴Las bases nucleotídicas subrayadas corresponden a la

introducción de sitios de restricción para *Bam*HI y *Sph*I respectivamente, que permiten el clonado en pSVP27. ⁵Tamaño correspondiente al amplicón sin inserto.

6.4. Electroforesis en geles de agarosa.

- 1) Para identificar y separar fragmentos de DNA, 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;
- 5) las bandas de DNA se visualizaron en *UV Transilluminator 2000* (BIO-RAD);
- 6) se estimó el tamaño de los fragmento de DNA por comparación con marcadores de peso molecular (Marcador de DNA 1 Kpb, Inbio Highway, “Marcador de DNA 100-1000 pb Inbio Highway y 1 Kb Plus 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.

6.5. Análisis filogenético de los resultados obtenidos mediante Rep-PCR.

Se identificaron individualmente las bandas polimórficas a partir de los perfiles electroforéticos obtenidos mediante Rep-PCR (ver ítem 6.3) de cada cepa comprendidas entre 0,25 y 5,00 kb. Posteriormente se construyó manualmente una matriz binaria de datos (0, ausencia de banda; 1, presencia de banda) con el fin de comparar los polimorfismos obtenidos en el grupo de muestras analizadas. Se generaron a continuación, 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 dendrogramas por el método UPGMA (media aritmética no ponderada) usando las rutinas SAHN y TREE del paquete informático mencionado.

7. Clonado y expresión de proteínas Cry individuales de *Bacillus thuringiensis*.

La metodología previamente descrita por Teixeira Correa *et al.* (2012) con modificaciones se utilizó para el clonado y expresión de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* y *cry2Ab* presentes en cepas de INTA TA21-2, INTA H48-5, svar. *kurstaki* HD-73, INTA H42-1 e INTA TA24-6 respectivamente. Estas cepas fueron seleccionadas debido a que el contenido en genes *cry* que porta cada una, facilitaron la amplificación inicial del gen de interés.

El plásmido empleado en este estudio fue el pSVP27 con un tamaño de 5601 pb (Crickmore y Ellar 1992). Incluye una secuencia promotor denominado pCyt, que se

localiza físicamente antes del inicio del gen de interés, señalando el inicio de la transcripción e impulsa la expresión de genes corriente abajo. Dicho promotor constituye su sistema regulador de la expresión dependiente de la fase de esporulación. Además posee secuencias adicionales como genes de resistencia a antibióticos, en este caso ampicilina y cloranfenicol, funcionales *E. coli* y *B. thuringiensis* respectivamente. Es un vector de expresión inducible que se utilizó en el presente estudio para el clonado de genes en *E. coli* a través de sus sitios de clonado múltiple, provisto de varias dianas únicas para diferentes enzimas de restricción (en este estudio *Bam*HI y *Sph*I) y para la expresión de dichos genes en *B. thuringiensis*. Por este motivo, se lo denomina vector *shuttle* ya que puede manipularse en al menos dos especies hospedadoras diferentes. (Fig. 2.1).

El DNA del vector pSVP27 fue obtenido mediante kit comercial “QIAprep Spin Miniprep Kit” (Qiagen, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se digirió de la misma forma que los insertos de interés (ver cuadro 8, ítem 7.1), generando extremos cohesivos. Seguidamente fue tratado con la enzima SAP (*Shrimp Alkaline Phosphatase*) (Promega), para eliminar los grupos fosfatos en los extremos y finalmente se conservó a -20 °C hasta su uso.

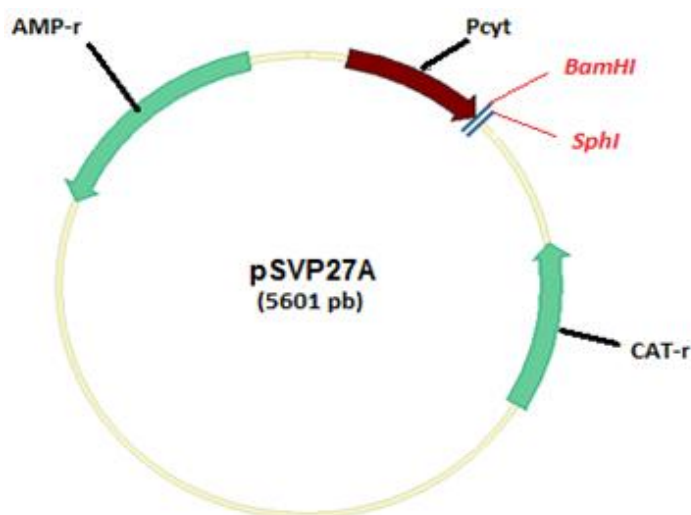


Fig. 2.1. Representación esquemática del plásmido pSVP27. Posee un gen de resistencia a ampicilina (AMP-r) y otro a cloranfenicol (CAT-r). Un sitio de inserción para un gen *cry*, en este caso entre los sitios de restricción para *Bam*HI y *Sph*I, y un promotor pCyt que dirige la expresión del mismo.

7.1. Clonado y expresión de genes *cry*.

- 1) el amplicón generado por “hot start” PCR conteniendo genes *cry*, fue corrido mediante electroforesis en un gel de agarosa 1% en buffer TAE 1x para verificar que el tamaño fuera correcto (ca. 3,5 kb para genes *cry1* y 1,9 kb para *cry2*);
- 2) este amplicón se purificó de la matriz del gel de agarosa utilizando el kit comercial *Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante;
- 3) se llevó a cabo la digestión del amplicón y del vector pSVP27 con *Bam*HI y *Sph*I incubándolos 3 h a 37°C (Cuadro 2.7);

Cuadro 2.7. Reacciones de digestión con enzimas de restricción.

Reactivos ¹	Inserto	Vector
Agua desionizada estéril	16 µl	6 µl
Buffer 10x “C”	6 µl	6 µl
DNA amplicón	30 µl	-
DNA vector	-	40 µl
Enzimas de restricción (<i>Bam</i>HI/<i>Sph</i>I)	1-1 µl	1-1 µl

¹Promega.

4) posteriormente se realizó la reacción de ligación entre el vector y el amplicón purificado (DNA inserto), incubándola 1 h a temperatura ambiente y luego colocándola a 16 °C durante toda la noche (Cuadro 2.8);

Cuadro 2.8. Reacción de ligación.

Reactivos ¹	Reacción	Control
Agua desionizada estéril	0,3 µl	3,3 µl
Buffer 10x T4 DNA Ligasa	0,5 µl	0,5 µl
DNA vector	1 µl	1 µl
DNA inserto	3 µl	-
Enzima T4 DNA Ligasa	0,2 µl	0,2 µl

¹Promega.

5) a continuación se transformaron los productos de ligación en células competentes de *Escherichia coli* XL-1 mediante electroporación. Para ello, las células de *E. coli* se descongelaron a temperatura ambiente y se colocaron en hielo. En un tubo eppendorf se mezcló 40 µl de las células con 1 µl del DNA a transformar. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación (0,2 cm, SIGMA) y se le aplicó el pulso. Se utilizó el Gene Pulser (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 25 µF, 200 Ohms y 2.5 kV. Inmediatamente después se añadió 960 µl de medio LB (Luria Bertani) (triptona, 10 g; extracto de levadura, 5 g; NaCl, 5 g; NaOH 1N 1 ml; agua desionizada c.s.p. 1 litro), y las células se transfirieron a un tubo eppendorf, incubándose por 1 h a 37°C. Se distribuyó 100 µl del cultivo sobre medio agarizado LB suplementado con ampicilina (concentración de uso 50 µg/ml) como agente de selección de colonias transformadas y se incubaron a 37°C durante 16 h. Asimismo se realizó un control de transformación, procesado en paralelo y siguiendo los pasos anteriores: mezclando DNA del vector (vector circular y cerrado covalentemente) con células competentes, sin DNA inserto (Cuadro 2.8);

6) se seleccionaron entre 10 y 50 colonias transformantes, y mediante PCR realizadas con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector se estimó el tamaño correcto del inserto. Se utilizó como control el clon recombinante transformado con pSVP27 sin inserto;

- 7) los clones que fueron identificados como portadores del plásmido recombinante conteniendo el inserto de interés, se inocularon en 20 ml de caldo TB (*Terrific Broth*) (SIGMA) con ampicilina (50 µg/ml), dejándolo crecer toda la noche a 37 °C con agitación de 250 rpm;
- 8) a partir de estos cultivos se purificaron los plásmidos por el método de extracción por lisis alcalina (ver ítem 7.3.);
- 9) a continuación los plásmidos con el inserto se transformaron mediante electroporación en células competentes de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* 4Q7, una cepa mutante no productora de cristales (acristalífera). Se mezcló 100 µl de las células con 5 µg del DNA a transformar. La mezcla se colocó en una cubeta de electroporación (0,2 cm, SIGMA) y se le aplicó el pulso eléctrico. Se utilizó el Gene Pulser (Bio-Rad) bajo las siguientes condiciones: 25 µF, 400 Ohms y 1.4 kV. Inmediatamente después se añadió 1,9 ml de caldo LB y se incubó 2 h a 30°C con agitación de 100 rpm. Se centrifugó el cultivo durante 2 min a 10.000 rpm (Sigma 1-15pk), y el *pellet* obtenido se resuspendió en 100 µl de medio LB fresco. Este volumen total se sembró en superficie sobre placas de agar LB suplementado con cloranfenicol (7 µg/ml) como agente de selección de las bacterias transformadas y se incubaron a 29°C durante 24 h. De la misma forma se procesó el vector sin inserto (control de transformación);
- 10) mediante PCR realizadas con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector y cebadores específicos para cada clase o subclase de gen *cry* clonado (ver ítem 6.3.3.), se estimó el tamaño correcto del inserto y la identidad del gen *cry* clonado respectivamente. Se utilizó como control el clon recombinante transformado con pSVP27 sin inserto;
- 11) se secuenciaron parcialmente los amplicones obtenidos por PCR utilizando los cebadores del vector (pSVP27F y pSVP27R) a partir de clones recombinantes de *B. thuringiensis* seleccionados (ver ítem 7.4.);
- 12) las colonias de los clones recombinantes de *B. thuringiensis* transformadas con genes de toxinas insecticidas se repicaron también a caldo BM suplementado con cloranfenicol (7 µg/ml), y se las cultivó y procesó según las condiciones descritas (ver ítem 2.). A partir de estos cultivos se analizó la expresión mediante microscopía de contraste de fases (ver ítem 4.) y geles SDS-PAGE de cultivos de los clones seleccionados (ver ítem 5.1.);
- 13) luego se determinó la patogenicidad de todos los clones recombinantes de *B. thuringiensis* seleccionados mediante bioensayos “burdos” con *C. pomonella* (ver ítem 3.1.1.) y particularmente los transformados con *cry2* con *A. aegypti* (ver ítem 3.3.);
- 14) finalmente, se cuantificó por el método de Bradford la concentración de proteínas totales contenidas en *pellet* seco y molido de cada clon recombinante solubilizados en condiciones alcalinas (1000 µg/ml) (ver ítem 5.3.).

7.2. Preparación de células electrocompetentes.

7.2.1. Preparación de células electrocompetentes de *Escherichia coli*.

Un ml de células de *E. coli* XL-1 crecidas durante una noche en caldo LB (Beckton Dickinson) sin NaCl, se inoculó en 500 ml del mismo medio e incubó con agitación de 250 rpm y 37 °C, durante 3 a 4 h hasta OD = 0,2 medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectrum SP2000uv). Los cultivos fueron colocados en hielo por 30

min y luego se centrifugaron a 4.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), a 4 °C durante 10 min en frascos estériles de 200 ml. Cada *pellet* se resuspendió en 100 ml de agua desionizada estéril fría y se centrifugó igual que en el paso anterior, resuspendiendo en 50 ml de glicerol 10% estéril frío. La centrifugación se repitió dos veces a 4.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), a 4 °C durante 15 min. Se reunieron todos los *pellets* resuspendiendo en 4 ml de glicerol 10% estéril frío. Después de repetir la centrifugación en las mismas condiciones descritas anteriormente, se resuspendió el *pellet* de células en 1 ml de glicerol 10% estéril frío. Las células electrocompetentes fueron conservadas a -70 °C hasta su uso.

7.2.2. Preparación de células electrocompetentes de *Bacillus thuringiensis*.

Se prepararon células electrocompetentes de la cepa acristalífera *B. thuringiensis* svar. *israelensis* 4Q7 mediante un protocolo modificado del reportado por Mahillon y Lereclus (2000). Se inoculó 1 ml de un cultivo crecido toda la noche en caldo LB (Beckton Dickinson) sin NaCl, en 500 ml del mismo medio a 30 °C y 250 rpm de agitación, durante aproximadamente 3 a 4h, hasta obtener una OD = 0,5-1 medida a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectrum SP2000uv). Se colocó el cultivo en hielo durante 30 min y se centrifugó a 6.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), a 4 °C durante 10 min utilizando frascos estériles de 200 ml. Luego de descartar el sobrenadante se resuspendieron las células en 150 ml de agua desionizada estéril fría por cada frasco, y se repitió la centrifugación y la posterior resuspensión en agua desionizada estéril. Nuevamente se repitió la centrifugación en las mismas condiciones, resuspendiendo esta vez en 150 ml de agua desionizada estéril fría por frasco, y luego en 5 ml de glicerol 10% estéril frío. Las fracciones fueron unificadas en un solo frasco y se centrifugaron a 6.000 rpm (Thermo Scientific Sorvall RC 6+), a 4°C durante 15 min. Finalmente se resuspendió el *pellet* de células en 2 ml de glicerol 10% estéril frío. Las células electrocompetentes fueron conservadas a -70°C hasta su uso.

7.3. Minipreparación de DNA plasmídico.

Para la purificación de DNA plasmídico de los clones obtenidos por transformación de *E. coli* XL-1 se utilizó el método de extracción por lisis alcalina. Los cultivos líquidos se realizaron transfiriendo el material adherido al tocar cada colonia con un *tip* estéril a tubos conteniendo 20 ml de caldo TB (*Terrific Broth*) con el agregado de ampicilina (50 µg/ml), y se incubaron a 37°C toda la noche con agitación de 250 rpm. Los cultivos se centrifugaron a 13.000 rpm (Sigma 1-15pk) durante 5 min y se resuspendió el *pellet* en 150 µl de una solución Glucosa/Tris/EDTA pH: 7,9 (GTE). Se agregó 250 µl de una solución fresca 0,2 N de NaOH/SDS 1%, mezclando por inversión e incubando luego por 5 min en hielo hasta la clarificación del cultivo. Se agregó 250 µl de acetato de potasio 3 M, mezclando suavemente por inversión y repitiendo la incubación en hielo. Se centrifugó a 12.000 rpm (Sigma 1-15pk) durante 10 min a T° ambiente transfiriendo el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio e incubándolo con ribonucleasa A a una concentración final de 10 µg/ml durante 1 h a 37°C. Se realizó una extracción con 300 µl de cloroformo, mezclando y centrifugando a 12.000 rpm (Sigma 1-15pk) durante 2 min para separar las fases. La fase acuosa se recuperó en un nuevo tubo y se repitió la extracción. Posteriormente, se agregó 1 volumen de isopropanol 100% mezclando por inversión y se centrifugó a 13.000 rpm (Sigma 1-15pk) durante 20 min. El *pellet* de DNA se lavó con etanol 70%,

centrifugando a 12.000 rpm (Sigma 1-15pk) por 5 min y se secó a temperatura ambiente. Se resuspendió el *pellet* en 30 µl de agua desionizada estéril.

7.4. Secuenciación parcial de clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* y genes 16S rDNA.

Se secuenciaron parcialmente los amplicones obtenidos por PCR utilizando los cebadores del vector (pSVP27F y pSVP27R) a partir de clones recombinantes de *B. thuringiensis* seleccionados y los cebadores B-K1/F y B-K1/R1 a partir de aislamientos de *B. thuringiensis* nuevos obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de *C. pomonella*, empleando los mismos cebadores (Cuadro 2.6).

Las secuenciaciones se realizaron por método de Sanger (1977) en electroforesis capilar con un secuenciador automático 3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) en el servicio de secuenciación del Instituto de Biotecnología (INTA, Castelar).

8. Aislamiento y conservación de nuevos *Bacillus thuringiensis*.

Se realizaron aislamientos de *B. thuringiensis* a partir de 32 larvas vivas y sanas de *C. pomonella* provenientes de dos regiones de Argentina libres de la aplicación de bioinsecticidas, siguiendo un protocolo previamente establecido en el laboratorio que se detalla a continuación. Las nuevas bacterias aisladas se incorporaron a la colección de bacterias entomopatógenas del IMYZA-INTA (Castelar).

8.1. Aislamiento de *Bacillus thuringiensis*.

- 1) Se colocó una larva en un tubo eppendorf estéril y se agregó 1,0 ml de agua desionizada estéril. La misma se machacó con ayuda de una cuchara de laboratorio y se homogenizó en agitador vórtex durante 20 s;
- 2) el tubo se incubó durante 12 min en baño térmico a 65 °C y posteriormente durante 5 min en baño de hielo;
- 3) se realizaron tres diluciones seriadas 1/10 con agua desionizada estéril;
- 4) se sembraron en superficie 100 µl de la suspensión y de sus diluciones en placas conteniendo Agar Nutritivo (Difco) suplementado con manganeso ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0,05 g/l). Con una espátula de Drigalsky se dispersó el volumen por toda la placa y en todas las direcciones, hasta percibir su completa absorción;
- 5) todas las placas se incubaron durante 48 h a 29 °C;
- 6) pasado el periodo de incubación, se observaron las placas comenzando por la que contenía la mayor dilución. A cada una de las colonias aisladas con características macroscópicas típicas de *B. thuringiensis* se le asignó un número correlativo no mayor a 20. Se realizaron preparados en fresco de las colonias y se observaron a 100X en un microscopio de contraste fases (ver ítem 4.). Las colonias que evidenciaron la presencia de cristales o en las que se sospechó de la presencia de los mismos se seleccionaron para el siguiente paso;
- 7) se realizaron aislamientos por agotamiento en superficie de las colonias seleccionadas en agar BM. Las placas se incubaron durante 48 h a 29 °C;

8) se realizaron preparados en fresco de colonias aisladas de cada una de las placas y se observaron a 100X en un microscopio de contraste fases (ver ítem 4.). Mediante esto confirmamos la pureza, existencia de cristales y la morfología de los mismos;

9) cada aislamiento de *B. thuringiensis* se repicó en agar BM y se incubó durante 96 h a 29 °C. Este material se utilizó posteriormente para su conservación.

8.2. Conservación de los aislamientos.

La conservación de los aislamientos nuevos de *B. thuringiensis* se realizó a través de las siguientes formas:

8.2.1. Conservación de la suspensión espora-cristal a -20 °C.

En un tubo eppendorf estéril se colocaron 1200 µl de agua desionizada estéril. Se recogió todo el material de un cultivo en agar BM obtenido tras 48 h de incubación a 29 °C y se homogenizó en agitador vórtex durante 30 s. Fracciones de 200 µl de este material se agregaron a 4 tubos eppendorf de 1,5 ml conteniendo previamente 400 µl de agua desionizada estéril. Finalmente, cada uno de los tubos con 600 µl de la suspensión espora-cristal se conservaron a -20 °C.

8.2.2. Conservación en tiras de papel.

Se tomaron 200 µl de la suspensión espora-cristal preparada en el ítem anterior y se repartió homogéneamente sobre 9 tiras de papel de filtro (1,5 x 0,5 cm) estériles. Se dejaron secar durante 3 h en cabina de flujo laminar. Posteriormente se colocaron de a tres tiras en tubos de tapa a rosca de 2 ml estériles. Éstos se conservaron a -20 °C.

9. Materiales y metodologías para el análisis exploratorio de las variables que influyen en la producción de proteínas insecticidas.

Los materiales y metodologías que se detallan a continuación se emplearon para la selección de un medio de cultivo apropiado y para el análisis exploratorio de variables del mismo que influyen en la producción de una cepa seleccionada por su toxicidad para *C. pomonella*, tomando como parámetro de medida la concentración de proteínas insecticidas producidas.

9.1. Preparación del inóculo.

A partir de un cultivo de la cepa en estudio en agar LB (Becton Dickinson) incubado a 29 °C durante 16 h, se tomó una colonia y se la inoculó en 1 ml del mismo caldo, incubándose bajo la misma condición de temperatura durante 8 h. Este cultivo se inoculó en 50 ml de caldo LB (Becton Dickinson) contenido en un erlenmeyer de 500 ml, incubándose durante 16 h a 29 °C con una agitación de 250 rpm hasta obtener un cultivo con una DO medida a 600 nm de 2,5.

9.2. Caldos de cultivo empleados.

Se evaluaron dos medios de esporulación de *B. thuringiensis* formulados en el laboratorio, como el Caldo BM y el Caldo Triptosa Fosfato Modificado (TFM), y otros tres reportados en la bibliografía; Caldo 1 (Ben Khedher *et al.* 2011), Caldo 2 (Arcas *et al.* 1987) y Caldo 3 (Bulla *et al.* 1980) (Cuadro 2.9).

Se sembraron erlenmeyers de 500 ml conteniendo 50 ml de los medios a evaluar con 500 µl del inóculo (ver ítem 9.1.), e incubados durante 72 h a 29 °C a 250 rpm.

Cuadro 2.9. Composición de los medios de cultivo empleados para la cepa seleccionada.

Componentes	Caldo BM (g/l)	Caldo TFM (g/l)	Caldo 1 (g/l)	Caldo 2 (g/l)	Caldo 3 (g/l)
Glucosa	5	2	22,5	8	1
Glicerol	-	-	4,8	4	-
Almidón	2,5	-	-	-	-
NaCl	2,5	5	-	-	-
(NH₄)₂SO₄	-	-	5,4	1	2
Extracto de Levadura	4	-	5,8	4	2
KH₂PO₄	1	-	1	-	-
K₂HPO₄	2,5	-	1	1	0,5
MgSO₄·7H₂O	0,25	0,25	0,3	1	0,02
MnSO₄·H₂O	0,1	0,1	0,008	0,03	0,05
FeSO₄	-	-	0,01	-	0,0005
CaCl₂·2H₂O	-	-		0,04	0,025
MnCl₂	-	-	-	-	-
CuSO₄	-	-	-	-	0,005
ZnSO₄·7H₂O	-	-	-	-	0,005
Na₂HPO₄	-	2,5	-	-	-
Triptosa	-	20	-	-	-

9.3. Diseño experimental para el análisis de variables del medio de cultivo que influyen en la producción de proteínas insecticidas.

La determinación de los componentes del medio que afectaban significativamente la producción de proteínas insecticidas se llevó a cabo mediante un diseño estadístico de Plackett-Burman según lo descrito por Ben Khedher *et al.* (2011). 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) (Cuadro 2.10).

Cuadro 2.10. Matriz con los 12 experimentos diseñados por Plackett-Burman.

Corrida	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	X ₅	X ₆	X ₇	X ₈
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
4	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1
5	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
6	+1	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1
7	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1	+1
8	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1	-1
9	+1	+1	+1	-1	+1	+1	-1	+1
10	-1	+1	-1	-1	-1	+1	+1	+1
11	-1	+1	+1	-1	+1	-1	-1	-1
12	+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, β_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 (Cuadro 2.11).

Cuadro 2. 11. Valores de los niveles de los distintos componentes del medio.

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

9.4. Parámetros de medición.

Se determinó para todos los experimentos la concentración de proteínas solubilizadas a partir de *pellets* de cada cultivo. Se tomó 555,5 μ l del cultivo y se

centrifugó a 11.000 rpm (Sigma 1-15 pk). Se descartó el sobrenadante, se realizó un lavado con 500 µl de agua desionizada estéril y se centrifugó nuevamente a 11.000 rpm (Sigma 1-15 pk). Este procedimiento se repitió dos veces más. El *pellet* se resuspendió en Na₂CO₃ 50 mM, pH 10,6 para solubilizar los cristales de proteínas insecticidas respetando las proporciones y condiciones de incubación establecidas en el ítem 5.2. Finalmente se cuantificaron las proteínas totales en el sobrenadante de acuerdo al método de Bradford (ver ítem 5.3.). 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).

Capítulo 3:

Resultados y Discusión

Capítulo 3: Resultados y Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio se dividieron en tres secciones principales:

- 1) Clonado y expresión de factores de virulencia activos de *Bacillus thuringiensis* y análisis de la toxicidad de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* para larvas de Carpocapsa (*Cydia pomonella* L.).
- 2) Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de Carpocapsa.
- 3) Selección de una cepa con alta actividad hacia larvas de *Cydia pomonella* y análisis de los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.

Sección 1: Clonado y expresión de factores de virulencia activos de *Bacillus thuringiensis* y análisis de la toxicidad de proteínas Cry de *B. thuringiensis* para larvas de Carpocapsa (*Cydia pomonella* L.).

Debido a que los cristales de las cepas silvestres contienen en general más de una proteína insecticida en su composición, es de interés en muchos casos conocer la toxicidad de cada una por separado para una determinada plaga (Sauka *et al.* 2007). Por lo tanto, es necesario clonar cada gen de interés y expresarlo individualmente.

En una primera etapa se amplificaron, clonaron y expresaron individualmente ciertos genes *cry* en una cepa acristalífera de *B. thuringiensis* svar. *israelensis* denominada 4Q7 (Jeong *et al.* 2014). Debido a la baja eficiencia de transformación que registra esta bacteria, fue necesario como paso previo, la obtención de los plásmidos recombinantes en *Escherichia coli*. Cada plásmido se utilizó separadamente para transformar la cepa 4Q7 y posteriormente, se evaluó la toxicidad de los distintos clones recombinantes de *B. thuringiensis*. Por otro lado, se cuantificó la concentración de proteínas totales producidas por cada clon recombinante, datos a partir de los cuales, se pudo estimar la concentración de cada proteína Cry producida.

En una segunda etapa, se determinó la toxicidad de las distintas proteínas Cry solubilizadas en condiciones alcalinas, individualmente y en combinaciones específicas, para larvas neonatas de *C. pomonella*. Se analizaron las interacciones entre las proteínas Cry utilizadas en diferentes mezclas.

1.1. Clonado y expresión individual de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

Para la expresión de proteínas Cry se han empleado distintos sistemas de expresión, tanto procariotas como eucariotas. En el primer caso, utilizando vectores plasmídicos para su expresión en *E. coli* (Bergamasco *et al.* 2011) y también en cepas acristalíferas de *B. thuringiensis* (Jain *et al.* 2006; Li *et al.* 2014). En el segundo caso, se

han utilizado vectores de baculovirus para expresar las proteínas Cry en células de insectos (Martins *et. al*, 2008).

Se amplificó mediante “hot start” PCR el marco de lectura abierta completo de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* y *cry2Ab* de las cepas INTA TA21-2, INTA H48-5, HD-73 del svar. *kurstaki*, INTA H42-1 e INTA TA24-6 respectivamente, utilizando los cebadores 1Ac-N-BamHI/1Ac-C-SphI y 2Aa-N-BamHI/2Aa-C-SphI (Fig. 3.1). Estos cebadores contienen en sus extremos sitios de restricción para las enzimas *Bam*HI y *Sph*I, que al ser incorporados en los extremos de los amplicones permitirán el correcto clonado de los genes en el vector pSVP27 (Teixeira Correa *et al.* 2012).

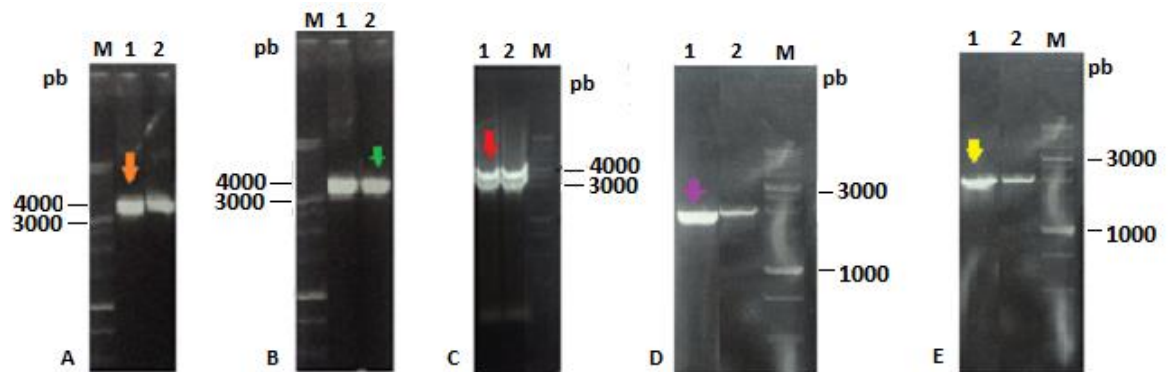


Fig. 3. 1. Electroforesis de amplicones correspondientes a genes de toxinas insecticidas en geles de agarosa al 1,0%, generados con los cebadores 1Ac-N-BamHI/1Ac-C-SphI y 2Aa-N-BamHI/2Aa-C-SphI mediante “hot start” PCR a partir de distintas cepas de *Bacillus thuringiensis*. (A): *cry1Aa*; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-1 (control positivo); 2, INTA TA21-2. (B): *cry1Ab*; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-1 (control positivo); 2, INTA H48-5. (C): *cry1Ac*; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-1 (control positivo); 2, svar. *kurstaki* HD-73. (D): *cry2Aa*; Líneas 1, INTA H42-1; 2, svar. *kurstaki* HD-1 (control positivo). (E): *cry2Ab*; Líneas 1, INTA TA24-6; 2, svar. *kurstaki* HD-1 (control positivo). Las flechas indican las bandas que corresponden a ca. 3500 pb (A, B y C) y ca. 1900 pb (D y E). M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

A continuación, los amplicones generados fueron digeridos con *Bam*HI y *Sph*I para permitir la ligación con el plásmido pSVP27 cortado con las mismas enzimas. Los productos de ligación se utilizaron para transformar la cepa XL-1 de *E. coli* mediante electroporación. Se seleccionaron entre 30 y 50 colonias transformantes resistentes a ampicilina, y mediante PCR con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector que flanquean el sitio de clonado de los insertos, se detectaron aquellos clones recombinantes conteniendo los genes de interés. Se utilizó como control, un clon de *E. coli* transformado con el vector sin inserto (Fig. 3.2).

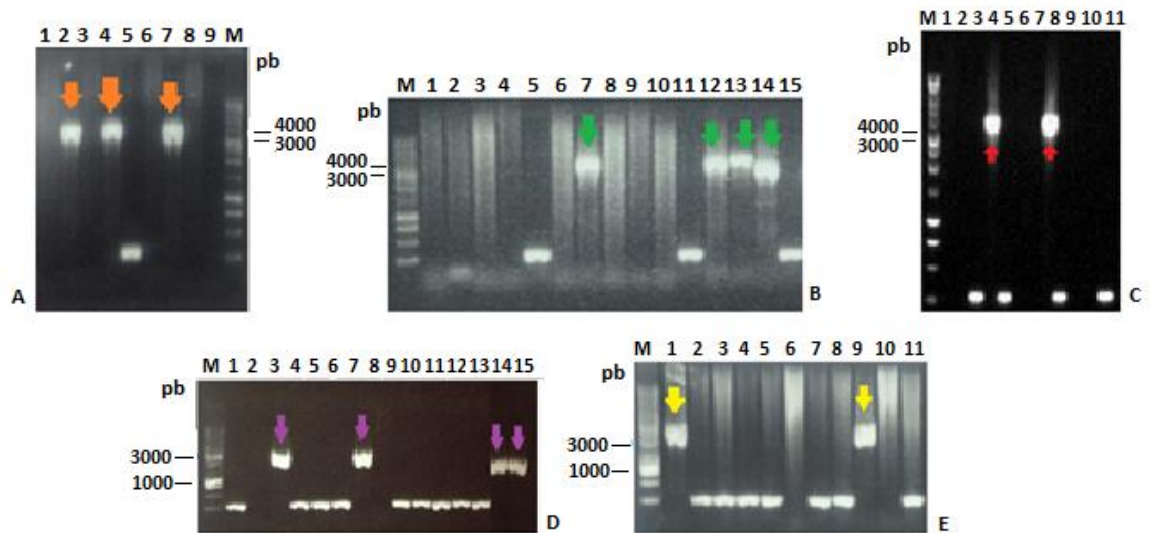


Fig. 3.2. Electroforesis de amplicones generados con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector en geles de agarosa al 1,0%, a partir de clones de *Escherichia coli* transformados con el producto de ligación del pSVP27 y los genes de toxinas insecticidas. (A): *cry1Aa*; Líneas 1, 3, 6, 8 y 9, colonias negativas; 2, 4 y 7, colonias de clones recombinantes; 5, colonia vector sin inserto. (B): *cry1Ab*; Líneas 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 y 10, colonias negativas; 7, 12, 13 y 14, colonias de clones recombinantes; 5, 11 y 15 colonias vector. (C): *cry1Ac*; Líneas 1, 2, 6, 7 y 10, colonias negativas; 4 y 8, colonias de clones recombinantes; 3, 5, 9 y 11 colonias vector. (D): *cry2Aa*; Línea 2, colonia negativa; 3, 7, 14 y 15 colonias de clones recombinantes; 1, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12 y 13, colonias vector. (E): *cry2Ab*; Líneas 6 y 10, colonias negativas; 1 y 9, colonias de clones recombinantes; 2, 3, 4, 5, 7, 8 y 11 colonias vector. Las flechas indican las bandas que corresponden a ca. 3900 pb (A, B y C) y ca. 2300 pb (D y E). M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

De aquellos clones recombinantes de *E. coli* que contenían los distintos genes de interés, se seleccionó uno de cada uno de ellos y se realizó la extracción de su DNA plasmídico con el objeto de transformarlo mediante electroporación en *B. thuringiensis* 4Q7. Se obtuvo un número bajo de clones transformantes, y en general, tras la realización de varios intentos fallidos (Cuadro 3.1). De éstos, sólo un número restringido se utilizó para estudios posteriores (Cuadro 3.1). A estos últimos se los nombró siguiendo una nomenclatura común que contempla el nombre del gen clonado, el número del clon obtenido para los casos donde se obtuvieron más de uno, seguido del nombre del vector y la cepa donde fue transformado (Cuadro 3.1). Por ejemplo: el clon recombinante “*cry1Ab*(19).pSVP27-4Q7” refiere al gen *cry1Ab*, clon número 19, clonado en el vector pSVP27 y transformado en *B. thuringiensis* 4Q7.

De los clones seleccionados, se realizó una extracción de DNA total por hervor simple (ver ítem 6.1.1. – “Materiales y métodos”) y mediante PCR realizadas con los cebadores del vector y cebadores específicos para cada subclase de genes *cry* (ver ítem 6.3.3. – “Materiales y métodos”), se estimó el tamaño correcto del inserto (Fig. 3.3), y la identidad de los genes clonados respectivamente (Fig. 3.4). Se utilizó como control sin inserto a pSVP27-4Q7.

Cuadro 3.1. Clones recombinantes obtenidos y seleccionados de *Bacillus thuringiensis* portando genes *cry*.

Gen	N° de clones obtenidos en <i>B. thuringiensis</i>	N° de clones en <i>B. thuringiensis</i> seleccionados	Nombre de los clones
<i>cry1Aa</i>	1	1	<i>cry1Aa</i> .pSVP27-4Q7
<i>cry1Ab</i>	más de 30	2	<i>cry1Ab</i> (19).pSVP27-4Q7 <i>cry1Ab</i> (24).pSVP27-4Q7
<i>cry1Ac</i>	1	1	<i>cry1Ac</i> .pSVP27-4Q7
<i>cry2Aa</i>	más de 30	3	<i>cry2Aa</i> (1).pSVP27-4Q7 <i>cry2Aa</i> (5).pSVP27-4Q7 <i>cry2Aa</i> (13).pSVP27-4Q7
<i>cry2Ab</i>	6	3	<i>cry2Ab</i> (1).pSVP27-4Q7 <i>cry2Ab</i> (4).pSVP27-4Q7 <i>cry2Ab</i> (6).pSVP27-4Q7

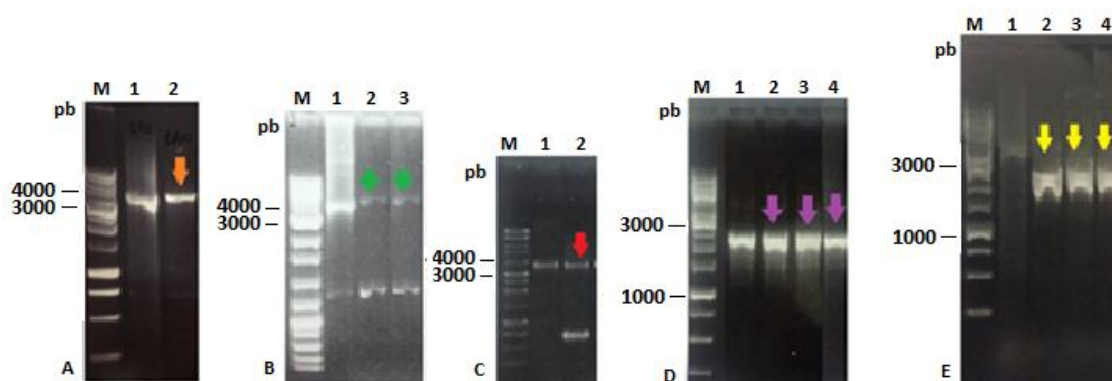


Fig. 3.3. Electroforesis de amplicones generados con los cebadores pSVP27F y pSVP27R específicos del vector en geles de agarosa al 1,0%, a partir de clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* transformados con pSVP27 conteniendo genes de toxinas insecticidas. (A): *cry1Aa*; Líneas 1, *cry1Aa*.pSVP27-XL1 (control positivo); 2, *cry1Aa*.pSVP27-4Q7. (B): *cry1Ab*; Líneas 1, *cry1Ab*.pSVP27-XL1 (control positivo); 2, *cry1Ab*(19).pSVP27-4Q7; 3, *cry1Ab*(24).pSVP27-4Q7. (C): *cry1Ac*; Líneas 1, *cry1Ac*.pSVP27-XL1 (control positivo); 2, *cry1Ac*.pSVP27-4Q7. (D): *cry2Aa*; Líneas 1, *cry2Aa*(1).pSVP27-XL1 (control positivo); 2, *cry2Aa*(1).pSVP27-4Q7; 3, *cry2Aa*(5).pSVP27-4Q7; 4, *cry2Aa*(13).pSVP27-4Q7. (E): *cry2Ab*; Líneas 1, *cry2Ab*(1).pSVP27-XL1 (control positivo); 2, *cry2Ab*(1).pSVP27-4Q7; 3, *cry2Ab*(4).pSVP27-4Q7; 4, *cry2Ab*(6).pSVP27-4Q7. Las flechas indican las bandas que corresponden a ca. 3900 pb (A, B y C) y ca. 2300 (D y E). M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

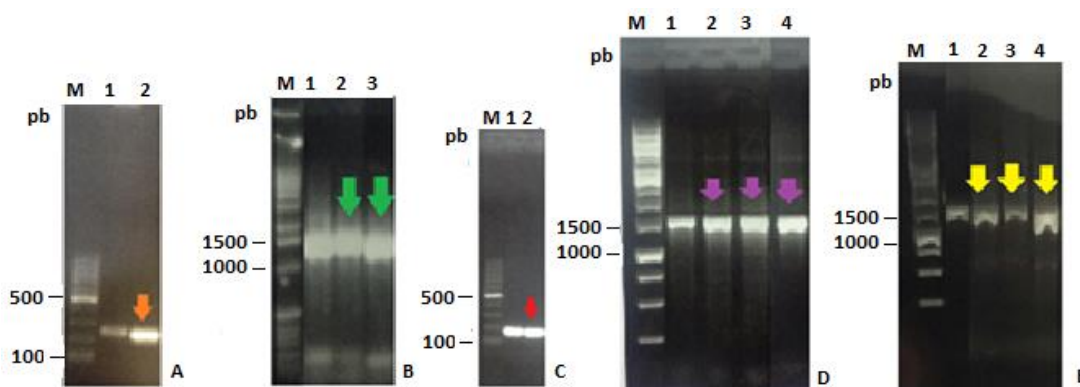


Fig. 3.4. Electroforesis de amplicones generados con cebadores específicos para cada clase o subclase de gen *cry* clonado en geles de agarosa al 1,0%. (A): *cry1Aa*; Líneas 1, INTA TA21-2 (control positivo); 2, *cry1Aa*.pSVP27-4Q7. (B): *cry1Ab*; Líneas 1, INTA H48-5 (control positivo); 2, *cry1Ab*(19).pSVP27-4Q7; 3, *cry1Ab*(24).pSVP27-4Q7. (C): *cry1Ac*; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-73 (control positivo); 2, *cry1Ac*.pSVP27-4Q7. (D): *cry2Aa*; Líneas 1, INTA H42-1 (control positivo); 2, *cry2Aa*(1).pSVP27-4Q7; 3, *cry2Aa*(5).pSVP27-4Q7; 4, *cry2Aa*(13).pSVP27-4Q7. (E): *cry2Ab*; Líneas 1, INTA TA24-6 (control positivo); 2, *cry2Ab*(1).pSVP27-4Q7; 3, *cry2Ab*(4).pSVP27-4Q7; 4, *cry2Ab*(6).pSVP27-4Q7. Las flechas indican las bandas que corresponden a 246 pb (A), 1400 pb (B), 180 pb (C) y 1500 pb (D y E). M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

Asimismo, se secuenciaron parcialmente los amplicones obtenidos por PCR utilizando los cebadores del vector con el objeto de verificar la correcta inserción de los genes *cry* clonados en pSVP27. En la figura 3.5 se presenta una representación esquemática del alineamiento de las secuencias nucleotídicas obtenidas para cada clon. Particularmente en el extremo 5' (Fig. 3.5A), se pudo identificar una región correspondiente al promotor (pCyt) de pSVP27 (secuencias 100% idénticas en todos los casos), y a continuación el codón de inicio de la traducción (ATG) de cada gen *cry* clonado. Por otro lado, se identificó en el extremo 3' (Fig. 3.5B), el correspondiente codón de terminación (TAA o TAG). También se logró identificar las secuencias correspondientes a los sitios de restricción *Bam*HI (Fig. 3.5A) y *Sph*I (Fig. 3.5B) flanqueando los mismos.

Una de las principales características de un sistema de expresión en *B. thuringiensis*, es que permite la cristalización de las proteínas Cry (Navas *et al.* 2014). El vector pSVP27 utilizado en este estudio se caracteriza por presentar, corriente arriba del sitio de clonado, un promotor (pCyt) dependiente de la esporulación que dirige la expresión (Fig. 2.1 – “Materiales y métodos”) (Teixeira Corrêa *et al.* 2012).

Habiendo comprobado el tamaño correspondiente del inserto, la identidad de los genes y la correcta inserción de los mismos en pSVP27, se verificó el clonado correcto de los genes de interés. Esto mismo hace suponer que la expresión de las proteínas Cry correspondientes en los clones recombinantes obtenidos sería factible.

En cultivos completamente esporulados de los clones seleccionados, se detectó la presencia de estructuras muy pequeñas libres, posiblemente cristales, mediante microscopía óptica de contraste de fases. Si bien debido a su tamaño no se pudieron establecer sus morfologías, quedó clara la presencia de los mismos cuando se los comparó con un clon que contenía el vector sin inserto (pSVP27-4Q7). Estas observaciones sugerirían que estos clones estarían expresando sus correspondientes genes *cry*. Sin embargo, para confirmar la presencia de estas estructuras se deberían analizar esporangios de estos clones recombinantes a través de microscopía electrónica de transmisión o de cultivos esporulados mediante microscopía electrónica de barrido.

El análisis en geles SDS-PAGE de los *pellets* de cultivos en caldo de esporulación obtenidos tras diferentes tiempos de incubación (de 24 a 96 hs) se ilustra en la figura 3.6. Lo esperable era que todos los clones recombinantes seleccionados que expresen genes *cry1* muestren una banda de 130 a 140 kDa a partir de las 72 h de incubación (Sauka y Benintende, 2008). En este estudio no se han detectado las mismas, con excepción de una banda de ca. 130 kDa en *cry1Ac.pSVP27-4Q7* a las 72 y 96 h de incubación, que correspondería a Cry1Ac (Fig. 3.6A). Por otro lado, lo esperable fue también que los clones recombinantes seleccionados que expresen genes *cry2* muestren una banda de 65 kDa a partir de las 72 h de incubación (Sauka y Benintende, 2008). Se observó una banda que correspondería a ca. 65 kDa que correspondería a la proteína Cry2Aa, a 72 h de incubación, sólo en el caso de los clones *cry2Aa(1).pSVP27-4Q7* y *cry2Aa(5).pSVP27-4Q7* (Fig. 3.6B). Estas bandas no fueron detectables a las 96 h (Fig. 3.6B). En el cuadro 3.2 se resumen los resultados del análisis de la expresión mediante geles SDS-PAGE de cultivos de los clones seleccionados.

Cuadro 3.2. Expresión de proteínas Cry de clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* analizada mediante geles SDS-PAGE.

Clon recombinante	Gen <i>cry</i> clonado	Expresión de la proteína Cry ¹
Cry1Aa.pSVP27-4Q7	<i>cry1Aa</i>	No detectada
Cry1Ab(19).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	No detectada
Cry1Ab(24).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	No detectada
Cry1Ac.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ac</i>	Detectada
Cry1Ia.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ia</i>	No detectada
Cry2Aa(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	Detectada
Cry2Aa(5).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	Detectada
Cry2Aa(13).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	No detectada
Cry2Ab(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	No detectada
Cry2Ab(4).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	No detectada
Cry2Ab(6).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	No detectada

¹Expresión de la proteína Cry de peso molecular esperado tras 72 y/o 96 h de incubación.

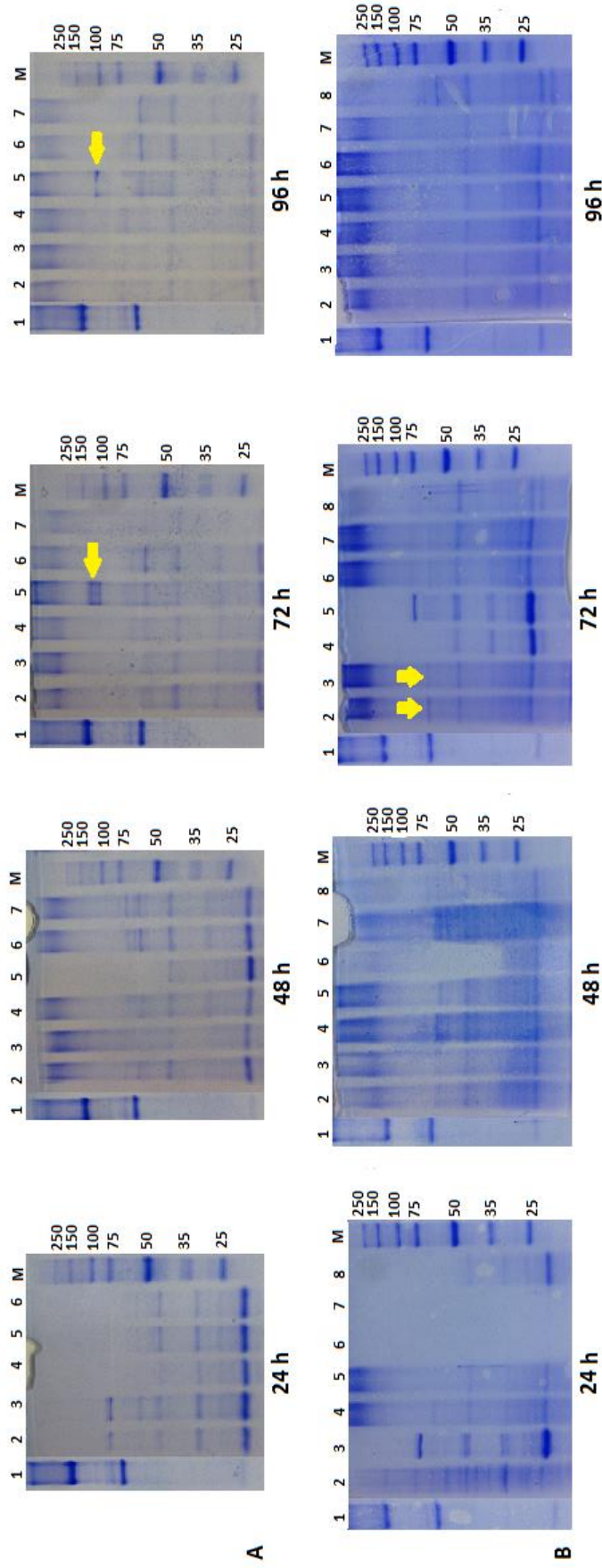


Fig. 3. 6. Análisis de expresión de *pellets* de cultivos en caldo de esporulación de los distintos clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* seleccionados obtenidos tras diferentes tiempos de incubación. (A): 24 h; Líneas: 1, svar. *kurstaki* HD-1 (referencia, 72 h); 2, cry1Aa.pSVP27-4Q7; 3, cry1Ab(19).pSVP27-4Q7; 4, cry1Ab(24).pSVP27-4Q7; 5, cry1Aa.pSVP27-4Q7; 6, pSVP27-4Q7 (control negativo). 48, 72 y 96 h; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-1 (control); 2, cry1Aa.pSVP27-4Q7; 3, cry1Ab(19).pSVP27-4Q7; 4, cry1Ab(24).pSVP27-4Q7; 5, cry1Aa.pSVP27-4Q7; 6, cry1Aa.pSVP27-4Q7 (control negativo). El clon cry1Aa.pSVP27-4Q7 no fue incluido a las 24 h de incubación debido a que su correspondiente cultivo no mostró signos evidentes de crecimiento bacteriano. (B): 24, 48, 72 y 96 h; Líneas 1, svar. *kurstaki* HD-1 (control); 2, cry2Aa(1).pSVP27-4Q7; 3, cry2Aa(5).pSVP27-4Q7; 4, cry2Aa(13).pSVP27-4Q7; 5, cry2Ab(1).pSVP27-4Q7; 6, cry2Ab(4).pSVP27-4Q7; 7, cry2Ab(6).pSVP27-4Q7; 8, pSVP27-4Q7 (control negativo). Las flechas indican las bandas que corresponden a ca. 130 kDa (A) y ca. 65 kDa (B). M: marcador de peso molecular “Broad Range Protein Molecular Weight Markers” (Promega).

Posteriormente, se determinó la patogenicidad de los 10 clones recombinantes de *B. thuringiensis* seleccionados en este estudio mediante bioensayos “burdos”. Se empleó la fracción de cultivo denominada biomasa (*pellet* seco y molido), en una concentración final de 1000 µg/ml de dieta y larvas neonatas de *C. pomonella* (Cuadro 3.3). También se incorporó en esta etapa el clon cry1Ia.pSVP27-4Q7 que expresa Cry1Ia (Pedarros *et al.* 2015). El clon pSVP27-4Q7 que contiene el vector pSVP27 sin inserto fue incorporado como control negativo. En particular para los clones recombinantes cry2Aa(1).pSVP27-4Q7, cry2Aa(5).pSVP27-4Q7 y cry2Aa(13).pSVP27-4Q7 transformados con *cry2Aa*, también se determinó la patogenicidad para larvas del cuarto estadio de *A. aegypti* (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3. Evaluación de la actividad insecticida de clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis* en *Cydia pomonella* y *Aedes aegypti*.

Clon recombinante	Gen cry clonado	Mortalidad (%) ¹ <i>C. pomonella</i>	Mortalidad (%) ¹ <i>A. aegypti</i>
cry1Aa.pSVP27-4Q7	<i>cry1Aa</i>	95,7±0,0	ND ²
cry1Ab(19).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	100,0±0,0	ND
cry1Ab(24).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	100,0±0,0	ND
cry1Ac.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ac</i>	17,4±0,0	ND
cry1Ia.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ia</i>	91,3±4,3	ND
cry2Aa(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	87,3±0,0	25,0±0,0
cry2Aa(5).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	90,1±2,4	20,0±0,0
cry2Aa(13).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	95,7±0,0	25,0±0,0
cry2Ab(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	1,4±2,4	ND
cry2Ab(4).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	0,0±0,0	ND
cry2Ab(6).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	0,0±0,0	ND
pSVP27-4Q7	-	0,0±0,0	0,0

¹Media ± DE. ²No determinado.

Los clones recombinantes analizados en estas condiciones mostraron un nivel de actividad insecticida de leve a elevado para *C. pomonella*, reportando mortalidades comprendidas entre el 17,4% y el 100,0%. La excepción la constituyeron los clones cry2Ab(1).pSVP27-4Q7, cry2Ab(4).pSVP27-4Q7 y cry2Ab(6).pSVP27-4Q7, que a pesar de las altas concentraciones ensayadas, no causaron mortalidad. El clon cry1Ac.pSVP27-4Q7 produjo una leve mortalidad, pero una reducción muy significativa en el peso de las larvas (0,00517±0,00125 g) en comparación con el clon pSVP27-4Q7 (0,10275±0,00271 g). Esta reducción en el peso quedó evidenciada a ojo desnudo (Fig. 3.7), y tras analizar los resultados de la prueba *t* de Student ($t = 46,16$; $p < 0,0005$). Además, cry2Aa(1).pSVP27-4Q7, cry2Aa(5).pSVP27-4Q7 y cry2Aa(13).pSVP27-4Q7 produjeron cierta mortalidad en *A. aegypti* nunca superior al 25%. En general los resultados concuerdan con lo esperado, ya que las toxinas Cry1 y Cry2A han sido reportadas como tóxicas para larvas de diversos lepidópteros, y lepidópteros y dípteros respectivamente, con la excepción de Cry2Ab que no es activa en larvas de *A. aegypti* específicamente (McNeil *et al.* 2011; Ricietto *et al.* 2016; Sauka *et al.* 2007; Shu *et al.* 2017; Yilmaz *et al.* 2017). Estas observaciones sugerirían que los clones analizados, con excepción de los transformados con *cry2Ab*, estarían expresando sus correspondientes genes *cry*.

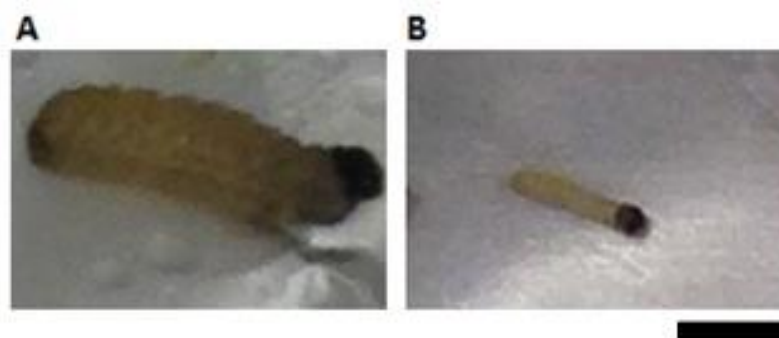


Fig. 3.7. Imágenes representativas de una larva sana (A) y una tratada (B) de *Cydia pomonella* al finalizar el bioensayo (lectura 5 d). Barra 1 mm.

A continuación, se cuantificó por el método de Bradford la concentración de proteínas totales contenidas en una suspensión de *pellet* seco y molido (1000 $\mu\text{g/ml}$) de cada clon recombinante en solución tamponada de carbonato de sodio (ver ítem 5.3 – “Materiales y métodos”) (Cuadro 3.4). A cada valor de la concentración de proteínas totales (proteínas de las esporas + Cry), se le restó la concentración de proteínas totales de pSVP27-4Q7 (proteínas de las esporas). Esto permitió la estimación de la concentración de cada proteína Cry producida en todos los clones recombinantes (Cuadro 3.4). Las concentraciones de proteínas Cry estimadas para cada clon fue variable a pesar de que el contexto del huésped para la producción de las proteínas insecticidas fue estandarizado (*B. thuringiensis* 4Q7). Si bien se desconoce a que se pueden deber estas variaciones, esto mismo concuerda con lo reportado por Li y Bouwer (2014). Estos autores obtuvieron diferentes concentraciones de proteínas Cry producidas por distintos clones recombinantes en *E. coli* BL1.

Finalmente, es posible inferir que los clones recombinantes obtenidos expresarían sus proteínas Cry respectivas, debido a que mostraron estructuras similares a cristales tras la esporulación, a que en algunos se detectó la banda de peso molecular esperado en los geles de SDS-PAGE, a que produjeron concentraciones de proteínas totales mayores que pSVP27-4Q7, pero sobre todo a que sus proteínas causaron mortalidad o alteraron significativamente el crecimiento de *C. pomonella*. Esta premisa se refuerza particularmente en aquellos clones que expresarían Cry2Aa, ya que además, causaron mortalidad en larvas de *A. aegypti*.

Asimismo, el nivel de expresión de los clones recombinantes sería muy bajo. Esta conclusión surge debido a que la concentración de proteína Cry sembrada en los geles de SDS-PAGE y estimada a partir de los datos presentados en el cuadro 3.4 (resultados no presentados), se encontrarían por debajo de la sensibilidad de detección de los geles teñidos con Coomassie blue R-250 (ca. 0,1 μg de proteína) (Lin *et al.* 2008). Esto denotaría la razón por la cuál en la mayoría de clones no se detectaron bandas de peso molecular esperado (Fig. 3.6. y Cuadro 3.2.). No obstante, se podría haber utilizado un método de tinción de geles de mayor sensibilidad (por ej.: tinción con plata) (Merril *et al.* 1979), o realizado ensayos de transferencia e inmunodetección (Western blot) para detectar las proteínas expresadas (Vazquez-Padron *et al.* 2004).

Cuadro 3.4. Cuantificación de proteínas totales y estimación de la concentración de proteínas Cry individuales en clones recombinantes de *Bacillus thuringiensis*.

Clon recombinante	Gen <i>cry</i> clonado	Concentración de proteínas totales (µg/mg biomasa)	Concentración de proteínas Cry (µg/mg biomasa)
cry1Aa.pSVP27-4Q7	<i>cry1Aa</i>	268,2	152,1
cry1Ab(19).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	242,3	126,2
cry1Ab(24).pSVP27-4Q7	<i>cry1Ab</i>	297,1	181,0
cry1Ac.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ac</i>	348,8	232,7
cry1Ia.pSVP27-4Q7	<i>cry1Ia</i>	223,3	107,2
cry2Aa(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	246,1	130,0
cry2Aa(5).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	376,2	260,1
cry2Aa(13).pSVP27-4Q7	<i>cry2Aa</i>	313,1	197,0
cry2Ab(1).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	161,7	45,6
cry2Ab(4).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	275,8	159,7
cry2Ab(6).pSVP27-4Q7	<i>cry2Ab</i>	162,5	46,4
pSVP27-4Q7	-	116,1	-

En la literatura existen trabajos en los que se describieron distintas estrategias para mejorar la expresión de proteínas Cry en clones recombinantes de *B. thuringiensis* (Deng *et al.* 2014). Se podría mejorar la expresión de los genes clonados en este estudio a través de otras estrategias que incluyan algún promotor más fuerte que el utilizado e incrementando el número de copias de los genes *cry* (Arantes y Lereclus 1991), introduciendo en el vector de expresión una secuencia Shine-Dalgarno estabilizadora de RNAm (Park *et al.* 1998), utilizando el vector construido en una mutante defectiva en la esporulación (Lereclus *et al.* 1995), o co-expresando una proteína *helper* (Shao *et al.* 2001).

De esta manera, en el presente trabajo de tesis se destaca la consolidación del establecimiento en el laboratorio de una estrategia para el clonado y expresión de genes *cry* en *B. thuringiensis*. Asimismo, la disponibilidad en el laboratorio de una colección de clones recombinantes que producen proteínas Cry individualmente, abre el camino a estudios nuevos donde se evalúe su toxicidad para otras especies de insectos plaga distintos a *C. pomonella*.

1.2. Toxicidad de proteínas Cry de *B. thuringiensis* para larvas de *Cydia pomonella*.

Se seleccionó al azar un clon recombinante de cada subclase de gen *cry* clonado para continuar con los estudios: cry1Aa.pSVP27-4Q7, cry1Ab(19).pSVP27-4Q7, cry1Ia.pSVP27-4Q7 y cry2Aa(5).pSVP27-4Q7. Los clones recombinantes que expresan Cry1Ac y Cry2Ab fueron descartados por la baja o nula actividad insecticida en *C. pomonella* (Cuadro 3.3).

1.2.1. Toxicidad de proteínas Cry individuales para *Cydia pomonella*.

Se realizaron bioensayos “finos” para determinar la virulencia en *C. pomonella* de cuatro proteínas Cry individuales diferentes obtenidas a partir de los clones recombinantes seleccionados (ver ítem 1.2). Se evaluaron seis concentraciones de cada preparación (suspensión de *pellet* seco y molido en solución tamponada de carbonato de sodio) con factores de dilución aproximados de 0,5 a 0,7, para la estimación de la CL₅₀ y de otros parámetros estadísticos (Cuadro 3.5). A partir del valor de CL₅₀ media (Cuadro 3.5), y considerando la concentración de proteínas Cry individuales producida por cada clon recombinante de *B. thuringiensis* (Cuadro 3.4), se estimó el valor de CL₅₀ real (Cuadro 3.5).

Cuadro 3.5. Toxicidad de proteínas Cry individuales de *Bacillus thuringiensis* para larvas neonatas de *Cydia pomonella*.

Proteína Cry	CL ₅₀ ¹ (µg/ml)	CV ²	Pendiente	χ ² (4gl) ³
Cry1Aa	45,5 [33,5-59,8] 30,4 [19,7-41,0] 42,0 [28,6-58,2]		1,9 1,7 1,6	3,6 1,5 1,4
Media⁴ Real⁵	39,3 6,0	0,20		
Cry1Ab	64,6 [43,6-112,9] 51,4 [33,2-91,8] 60,6 [42,6-96,1]		1,3 1,2 1,5	4,7 3,1 0,6
Media Real	58,9 7,4	0,12		
Cry1Ia	153,5 [110,6-224,0] 137,5 [97,9-203,2] 123,6 [87,6-171,1]		1,8 1,7 1,7	3,4 6,7 3,8
Media Real	138,2 14,8	0,11		
Cry2Aa	128,7 [83,2-172,0] 118,1 [83,6-151,0] 87,3 [55,8-116,5]		1,8 2,4 2,3	1,7 0,8 0,5
Media Real	111,4 29,0	0,19		

¹Concentración letal media y límites de confianza del 95%; ²Coefficiente de variación; ³Chi-cuadrado con 4 grados de libertad; ⁴Media, CL₅₀ promedio de tres repeticiones. ⁵Real, CL₅₀ promedio real.

A partir de los datos de CL₅₀ real, se pudo inferir que las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab resultaron ser las más tóxicas, demostrando un nivel de acción similar. A su vez, ambas resultaron ser aproximadamente dos veces más tóxicas que Cry1Ia y entre cuatro a cinco veces más que Cry2Aa (Cuadro 3.5).

Hasta el momento no existen trabajos publicados en los que se describa la toxicidad de proteínas Cry individuales para larvas de una población nativa de *C. pomonella*. En la literatura solo se hallan algunos reportes puntuales en los que se describió la actividad insecticida de proteínas individuales provenientes de poblaciones europeas (Baranek *et al.* 2015, Boncheva *et al.* 2006, Rang *et al.* 2000). De la comparación de los resultados experimentales de este trabajo de tesis con estos estudios,

surgen diferencias entre las toxicidades relativas de Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Cry1Ia y Cry2Aa. Mientras que en este trabajo Cry2Aa resultó ser de las menos tóxicas (Cuadro 3.5), Rang *et al.* (2000) reportaron que Cry2Aa fue la más tóxica, seguida de Cry1Aa y Cry1Ab. Por otra parte, se destaca en este trabajo que Cry1Ac resultó prácticamente no tóxica (Cuadro 3.3), mientras que Boncheva *et al.* (2006) reportaron un nivel de actividad insecticida moderado para esta proteína. Además, reportaron las toxicidades de otras 8 proteínas Cry1, resultando Cry1Da como la más tóxica, seguida de Cry1Ab, Cry1Ba y Cry1Ac, mientras que Cry1Aa, Cry1Fa y Cry1Ia, resultaron menos tóxicas. Cry1Ca y Cry1Cb no mostraron actividad. Más recientemente, Baranek *et al.* (2015) informaron una actividad insecticida considerable de las proteínas Vip3Aa58 y Vip3Aa59, proteínas que no han sido analizadas en este estudio.

Boncheva *et al.* (2006) han adjudicado este tipo de diferencias al uso de proteínas Cry intactas en lugar de solubilizadas y a los distintos métodos de bioensayo empleados con *C. pomonella*. Sin embargo, debido a que se compartió una metodología similar de análisis, dicha consideración no sería válida para explicar las diferencias encontradas en relación al presente estudio. Por lo tanto, existirían otras razones que permitirían una mejor explicación.

Una de estas razones podría estar dada por diferencias en la microbiota de las distintas poblaciones de *C. pomonella* estudiadas, y que actuarían sobre la actividad biológica de las toxinas. Paramasiva *et al.* (2014) asociaron la presencia y/o ausencia de ciertas especies bacterianas en diferentes poblaciones de *Helicoverpa armigera* H. (Lepidoptera: Noctuidae) de la India, con la susceptibilidad a las toxinas de *B. thuringiensis*. Otra de estas razones podría atribuirse a que existan variaciones genéticas en las distintas poblaciones de *C. pomonella* que se comparan, determinando cambios en la susceptibilidad a distintas proteínas insecticidas. Esta hipótesis se puede sustentar, entre otros, en los reportes previos de Tabashnik *et al.* (1997) y Monnerat *et al.* (2006). En ellos, se relacionó la variabilidad genética de distintas poblaciones de *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) y de *Spodoptera frugiperda* S. (Lepidoptera: Noctuidae), obtenidas de regiones distantes geográficamente, con diferencias en la susceptibilidad a distintas proteínas Cry1. En el caso de *P. xylostella*, se sabe que el mecanismo de resistencia principal a Cry1 puede asociarse con una nula o escasa unión de las toxinas al receptor en el intestino medio (Ferré *et al.* 1991), y que su herencia estaría controlada por un gen (o unos pocos genes) autosómico recesivo (Tabashnik *et al.* 1997). Se han relacionado mutaciones en los receptores con cambios en la susceptibilidad a toxinas Cry1, lo cual corresponde a las expectativas basadas en el modelo de unión (Ballester *et al.* 1999, Baxter *et al.* 2008). No obstante, cualquier mutación que altere cualquiera de los pasos en el mecanismo de acción de las proteínas insecticidas de *B. thuringiensis* podría conducir a cambios de susceptibilidad o a la resistencia, y diferentes poblaciones de un mismo insecto podrían desarrollar distintos mecanismos de resistencia a proteínas insecticidas específicas (Pigott y Ellar 2007).

Por todo lo expuesto hasta aquí, no sería inadecuado especular que la población nativa de *C. pomonella* utilizada en este estudio presente variaciones genotípicas con respecto a las poblaciones europeas. Asimismo, podrían haberse acumulado mutaciones durante la evolución que hayan modificado el mecanismo de acción de las proteínas Cry2Aa y Cry1Ac en particular, causando pérdidas de susceptibilidad en la población nativa de *C. pomonella*. Sin embargo, se requerirían estudios numerosos sobre la población nativa y las poblaciones europeas para confirmar lo planteado.

Por otro lado, se destacan en la literatura trabajos que describieron la toxicidad de proteínas Cry y Vip individuales para larvas de otros lepidópteros tortricídeos distintos de *C. pomonella*. Van Frankenhuyzen *et al.* (1997), reportaron que Cry9Ca fue significativamente más tóxica para *Choristoneura fumiferana* C. que Cry1Ab, Cry1Ba, Cry1Ca, Cry1Da, Cry1Ea, Cry1Fa. Ruíz de Escudero *et al.* (2007) publicaron estudios sobre la toxicidad de otras 7 proteínas Cry para *Lobesia botrana* D. y Sch. y obtuvieron que Cry9Ca resultó también la más activa, seguida de Cry2Ab, Cry1Ab, Cry2Aa y Cry1Ia, mientras que Cry1Fa y Cry1Ja no fueron activas. Sauka *et al.* (2007) describieron en *C. aporema* a Cry1Ab y Cry1Ac como las más activas, seguidas de Cry9Ca, Cry1Aa, Cry1Ca y Cry1Ba que mostraron un nivel de toxicidad bajo. Cry1Da no mostró actividad insecticida, ni ningún efecto en el crecimiento de *C. aporema*. Por otro lado, Li y Bouwer (2012) obtuvieron que Cry2Aa y Cry1Ac resultaron las más tóxicas para *Thaumatotibia leucotreta* M., seguido de Cry1Ab y Cry1Aa, y por último, Cry9Aa y Cry1Ca. Finalmente, Ricietto *et al.* (2016) reportaron que Vip3Aa y Cry1Aa fueron las más activas en *Grapholita molesta* B., seguidas por Cry1Ac, Vip3Af y Cry1Ca, mientras que Vip3Ca fue inactiva. De igual modo que cuando se compararon estudios en *C. pomonella*, se observaron diferencias entre las toxicidades relativas de proteínas insecticidas, y además no se logró identificar una proteína insecticida más activa que sea común en todos los casos estudiados. Esto era de esperar, ya que si existieron estas diferencias haciendo comparaciones intraespecie, resultó lógico que las mismas se mantengan al realizar comparaciones interespecies dentro de la Familia Tortricidae.

1.2.2. Toxicidad de mezclas de proteínas Cry para *Cydia pomonella* y análisis de las interacciones entre ellas.

Es extensamente conocido que ciertos perfiles de genes *cry* son detectados con mayor frecuencia que otros en *B. thuringiensis*. Es frecuente el hallazgo de aislamientos de *B. thuringiensis* que porten combinaciones de varios genes *cry1A*, generalmente junto a genes *cry1I* y *cry2A* demostrando una ligación genética fuerte entre ellos (Armengol *et al.* 2007; Bravo *et al.*, 1998; Sauka y Benintende 2017). Considerando la existencia de esta clase de asociaciones, se ensayaron 5 mezclas de proteínas Cry solubilizadas y se calcularon sus factores de sinergismo (FS). Las mezclas evaluadas se prepararon combinando iguales proporciones de las diferentes proteínas insecticidas.

En el cuadro 3.6 se muestra la concentración letal de las mezclas de proteínas Cry (analizadas por Probit) y el FS calculado mediante el uso de la ecuación de Tabashnik (Tabashnik 1992). Si el valor de CL₅₀ teórico es igual al de CL₅₀ experimental, entonces el efecto observado es considerado aditivo y el FS [CL₅₀ (teórico)/CL₅₀ (experimental)] es igual a 1. Por otra parte, el efecto observado es antagonista o sinérgico si el FS es más bajo o más alto que 1 respectivamente (Poncet *et al.* 1995).

Los efectos de las interacciones entre diferentes proteínas Cry1 y Cry2 producidas individualmente han sido estudiados previamente por varios autores en distintas especies de lepidópteros (Li y Bouwer 2014; Sauka *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2010). De acuerdo a nuestro conocimiento, este tipo de interacciones no se conoce en *C. pomonella* hasta el momento. Solo se ha reportado en esta plaga el efecto sinérgico de proteínas Vip3Aa combinadas con distintas proteínas Cry (Baranek *et al.* 2017).

Cuadro 3.6. Toxicidad de mezclas de proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* para larvas neonatas de *Cydia pomonella* y cálculo del factor de sinergismo utilizando la fórmula de Tabashnik.

Mezcla	CL ₅₀ (experimental) ¹ (µg/ml)	CV ²	Pendiente	χ ² (4gl) ³	CL ₅₀ (teórico) ⁴ (µg/ml)	FS ⁵
Cry1Aa/Cry1Ia	87,9 [63,6-126,6] 66,0 [48,0-116,5] 52,6 [38,6-68,8]		1,6 2,3 2,0	2,0 1,0 0,8		
Media	68,8	0,26			61,3	0,9
Cry1Ab/Cry1Ia	31,5 [21,2-42,3] 44,0 [29,8-60,7] 32,7 [18,1-48,4]		1,8 1,0 1,3	5,3 3,7 2,0		
Media	36,1	0,19			82,6	2,3
Cry1Aa/Cry1Ab	43,7 [29,3-70,1] 33,6 [20,0-57,9] 29,7 [9,4-5-85,6]		1,3 1,0 1,3	3,5 3,7 7,4		
Media	35,7	0,20			47,1	1,3
Cry1Aa/Cry2Aa	87,2 [63,5-149,2] 98,4 [66,1-206,7] 87,8 [61,1-159,8]		1,3 1,6 1,4	2,3 3,2 6,4		
Media	91,1	0,07			9,9	0,1
Cry1Ab/Cry2Aa	42,9 [19,4-74,4] 37,8 [28,6-47,4] 57,2[43,8-76,0]		2,2 2,3 2,0	8,4 6,0 4,2		
Media	46,0	0,22			11,8	0,3

¹Concentración letal media y límites de confianza del 95%; ²Coeficiente de variación; ³ Chi-cuadrado con 4 grados de libertad; ⁴Media, CL₅₀ promedio de tres repeticiones. ⁴ CL₅₀ teórica, calculada con la fórmula de Tabashnik; ⁵Factor de Sinergismo.

En este estudio, el FS que se calculó para la mezcla de proteínas Cry1Ab/Cry1Ia mostró un FS mayor que 1, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambas proteínas Cry para *C. pomonella* (Cuadro 3.6). Este tipo de interacciones no se halla descrito en la literatura, por lo que constituiría el primer reporte de esta interacción sinérgica en lepidópteros. Por otro lado, ensayos de unión *in vitro* con toxinas biotiniladas a vesículas de membrana de intestino medio de *L. botrana* y *Earias insulana* B. (Lepidoptera: Noctuidae), revelaron que Cry1Ab no comparte sitios de unión con Cry1Ia (Ruíz de Escudero *et al.* 2006). El hecho de que *L. botrana* y *C. pomonella* pertenezcan a la misma Familia, podría especular que esta misma característica sea compartida también por *C. pomonella*. Esto a su vez permitiría sugerir que el empleo combinado de Cry1Ab y Cry1Ia para el control de esta plaga sería viable. Sin embargo, se deberían realizar ensayos de unión entre estas proteínas Cry y vesículas de membrana del intestino medio de *C. pomonella* para confirmar esta hipótesis.

Por otro lado, las mezclas Cry1Aa/Cry2Aa y Cry1Ab/Cry2Aa mostraron un FS menor a 1, sugiriendo un efecto antagonista (Cuadro 3.6). Considerando la relación cercana entre Cry1Aa y Cry1Ab, el hallazgo del mismo tipo de interacción entre sus combinaciones con Cry2Aa era de esperar. Por otra parte, el efecto antagonista observado en este estudio para estas combinaciones de proteínas discrepan con lo

publicado previamente por Li y Bouwer (2014), quienes observaron solo un efecto aditivo cuando ensayaron esas combinaciones en *H. armigera*. Estas diferencias destacan la importancia del análisis de las interacciones de proteínas insecticidas con diferentes insectos, en lugar de intentar extrapolar los efectos de una especie a otra. Por otro lado, al tratar de explicar interacciones antagónicas como las observadas en este estudio, algunos autores han sugerido que las dos proteínas de la mezcla podrían formar un complejo que llevaría a su inactivación (Lemes *et al.* 2014). Otra explicación especulativa sería que ese antagonismo resultaría de la interacción de ambas proteínas con la misma proteína de membrana, independientemente de que se unan o no a los mismos epítopes (Lemes *et al.* 2014). Se necesita más trabajo para hallar a qué nivel están teniendo lugar las interacciones en *C. pomonella* e, idealmente, para identificar los determinantes responsables de tales interacciones.

Finalmente, Cry1Aa/Cry1Ia y Cry1Aa/Cry1Ab presentaron un FS cercano a 1 evidenciando un efecto aditivo entre las mismas. Este tipo de interacciones no se halla descrito en la literatura para Cry1Aa/Cry1Ia, por lo que constituiría también el primer reporte de esta interacción aditiva en lepidópteros. Contrariamente, la mezcla Cry1Aa/Cry1Ab ha sido ensayada en varias especies de lepidópteros. Se ha observado que el tipo de interacción producida para dicha mezcla es variable, pudiendo ser aditiva sinérgica o antagónica según el insecto objeto de evaluación (Gao *et al.* 2010; Lee *et al.* 1996; Li y Bouwer 2014; Sauka *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2010). En principio, se podría pensar que el tipo de interacción para esta mezcla se compartiría entre miembros de la misma familia de lepidópteros ensayada. Cry1Aa/Cry1Ab evidenciaron un efecto aditivo en los tortricidos *C. pomonella* y *C. aporema* ensayados en este estudio (Sauka *et al.* 2007). No obstante, cuando se empezó a analizar las interacciones entre insectos de diferentes especies pertenecientes a otras familias se observó que no es fácil la generalización, y lo evidenciado en tortricidos solo sería un caso puntual. En el caso de noctuidos, Cry1Aa/Cry1Ab evidenciaron un efecto sinérgico en *Sesamia inferens* W. (Gao *et al.* 2010), y un efecto antagónico en *H. armigera* (Li y Bouwer 2014). En el caso de ciertos pirálidos, se evidenciaron también diferencias en el tipo de interacción para Cry1Aa/Cry1Ab en *Chilo suppressalis* W. (efecto sinérgico) y *Chilo partellus* S. (efecto aditivo) (Gao *et al.* 2010; Sharma *et al.* 2010).

Teniendo en consideración que en este estudio las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab fueron las que presentaron mayor virulencia para *C. pomonella*, se propone el uso de cualquiera de ellas individualmente para el control óptimo de este insecto plaga en nuestra región, ya sea formando parte de bioinsecticidas de primera generación o de organismos genéticamente modificados (por ejemplo, bacterias o plantas) expresando esas proteínas insecticidas. Asimismo, no se descarta el uso de Cry1Ab junto a Cry1Ia debido al buen grado de virulencia y al efecto sinérgico mostrado entre ambas. Sin embargo, para prevenir el desarrollo potencial de resistencia en *C. pomonella*, especialmente por un mecanismo basado en la alteración del receptor, deberían realizarse ensayos *in vitro* entre estas proteínas Cry y vesículas de membrana del intestino medio del insecto para descartar si comparten el mismo sitio de unión (Ruiz de Escudero *et al.* 2006). Por otro lado, el uso combinado de Cry1Aa o Cry1Ab con Cry2Aa no se recomendaría debido al efecto antagonista que surgió de la interacción entre ellas. El empleo potencial de otras proteínas insecticidas no incluidas en este estudio tendrían que considerarse, por lo que deberían ser incluidas en estudios futuros que evalúen su actividad insecticida en la población nativa de *C. pomonella*. Tal sería el caso de las proteínas Cry1Da y Cry9Ca, que han sido reportadas como las más activas en una población europea de *C. pomonella* (Boncheva *et al.* 2006), y en otros tortricidos

respectivamente (Ruíz de Escudero *et al.* 2007; van Frankenhuyzen *et al.* 1997), y de las Vip3Aa por su efecto sinérgico junto a ciertas proteínas Cry también en *C. pomonella* (Baranek *et al.* 2017).

▪ Resumen de los resultados obtenidos en la sección 1.

- Se seleccionaron 10 clones recombinantes de *B. thuringiensis* transformados con *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry2Aa* y *cry2Ab*.
- En cultivos completamente esporulados de los clones seleccionados, se detectó la presencia de estructuras muy pequeñas libres (posiblemente cristales) mediante microscopía óptica de contraste de fases.
- El análisis mediante SDS-PAGE de los *pellets* de cultivos en caldo de esporulación mostró sólo en *cry1Ac.pSVP27-4Q7* una banda correspondiente a *ca.* 130 kDa (Cry1Ac) a las 72 y 96 h de incubación, y sólo en el caso de los clones *cry2Aa(1).pSVP27-4Q7* y *cry2Aa(5).pSVP27-4Q7* una banda de *ca.* 65 kDa (Cry2Aa) a las 72 h de incubación. Estas últimas no fueron detectables a las 96 h.
- Los clones recombinantes analizados mostraron un nivel de actividad insecticida de leve a elevado para *C. pomonella*, reportando mortalidades comprendidas entre el 17,4% y el 100,0%. La excepción la constituyeron los clones *cry2Ab(1).pSVP27-4Q7*, *cry2Ab(4).pSVP27-4Q7* y *cry2Ab(6).pSVP27-4Q7*, que a pesar de las altas concentraciones ensayadas, no causaron mortalidad.
- El clon *cry1Ac.pSVP27-4Q7* produjo una leve mortalidad, pero una reducción muy significativa en el peso de las larvas ($0,00517 \pm 0,00125$ g) en comparación con el clon *pSVP27-4Q7* ($0,10275 \pm 0,00271$ g).
- Los clones *cry2Aa(1).pSVP27-4Q7*, *cry2Aa(5).pSVP27-4Q7* y *cry2Aa(13).pSVP27-4Q7* causaron mortalidad en *A. aegypti*.
- Las concentraciones de proteínas Cry estimadas para cada clon recombinante fue variable a pesar de que el contexto del huésped para la producción de las proteínas insecticidas fue estandarizado (*B. thuringiensis* 4Q7).
- Las proteínas Cry1Aa y Cry1Ab resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella* con una CL_{50} de 6,0 µg/ml y 7,4 µg/ml respectivamente, seguido de la Cry1Ia con una CL_{50} de 14,8 µg/ml, y finalmente la Cry2Aa con una CL_{50} de 29,0 µg/ml.
- El FS calculado para la mezcla de proteínas Cry1Ab/Cry1Ia mostró un FS mayor que 1, sugiriendo un efecto sinérgico entre ambas proteínas Cry.
- Las mezclas Cry1Aa/Cry2Aa y Cry1Ab/Cry2Aa mostraron un SF menor a 1, sugiriendo un efecto antagonista.
- Las mezclas Cry1Aa/Cry1Ia y Cry1Aa/Cry1Ab presentaron un FS cercano a 1, evidenciando un efecto aditivo entre las mismas.

Sección 2: Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de Carpocapsa.

Durante los últimos años, se han establecido en distintas partes del mundo, colecciones de *B. thuringiensis* con el objeto de hallar nuevas cepas productoras de factores de virulencia que posean mayor poder insecticida o tóxicas para insectos en los que no se han reportado actividad (Bravo *et al.* 1998; Carozzi *et al.* 1991; Sauka y Benintende 2017; Uribe *et al.* 2003; Wang *et al.* 2003). Una estrategia común de aislamiento incluye muestrear zonas donde conviven los insectos y el cultivo afectado

con el objeto de obtener *B. thuringiensis* tóxicos para la plaga (Ohba y Aratake 1994). En estos ambientes es factible encontrar larvas de insectos muertos que pueden constituir una fuente interesante de aislamientos de *B. thuringiensis* (Cavados *et al.* 2001; Konecka *et al.* 2007; Liu *et al.* 2014a). No obstante, el aislamiento de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de insectos no ha sido estudiado. Se describe en la presente sección, el aislamiento, y caracterización fenotípica y genotípica de *B. thuringiensis*, obtenidos de larvas vivas y sanas de *Cydia pomonella* provenientes de zonas de producción.

2.1. Aislamiento, identificación y caracterización preliminar de nuevos *Bacillus thuringiensis*.

Se realizaron aislamientos de *B. thuringiensis* a partir de 32 larvas vivas y sanas de *C. pomonella*, provenientes de dos regiones de Argentina libres de la aplicación de bioinsecticidas (Cuadro 3.7). Estos aislamientos se realizaron siguiendo el protocolo descrito previamente (ver ítem 8.1- “Materiales y métodos”).

Se obtuvieron 8 aislamientos nativos de *B. thuringiensis* que fueron incorporados a la “Colección de bacterias entomopatógenas” perteneciente al Instituto de Microbiología y Zoología Agrícola (IMYZA) - INTA. La presencia de *B. thuringiensis* se identificó en un 9,4% (3/32) de las larvas estudiadas (Cuadro 3.7). Las larvas a partir de las cuales se identificó *B. thuringiensis* brindaron entre 1 y 5 aislamientos, y compartieron el mismo lugar de procedencia (Cuadro 3.7).

Cuadro 3.7. Procedencia de las larvas de *Cydia pomonella* analizadas y número de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* obtenidos.

Código de muestra	Procedencia	Número de aislamientos
L274	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L275	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L276	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	5
L277	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	2
L278	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L279	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L280	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	1
L281	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L282	Tunuyán, Mendoza (Finca Hinojosa G. Smith)	0
L283	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L284	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L285	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L286	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L287	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L288	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L289	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L290	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L291	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0

L292	Tunuyán, Mendoza (Oasis Centro)	0
L294	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L295	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L296	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L297	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L298	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L299	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L300	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L301	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L302	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L303	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L304	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L305	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0
L306	Alto Valle, Río Negro (Villa Regina-Chacra Pacenti)	0

Los aislamientos de *B. thuringiensis* fueron identificados por la presencia de cristales parasporales observados bajo microscopio de contraste de fases. La morfología de los mismos correspondió en todos los casos a cristales ovoides (Cuadro 3.8), ubicándose éstos entre las formas detectadas con menor frecuencia en colecciones de *B. thuringiensis* de diversas partes del mundo. Los cristales bipiramidales y cúbicos son los que se encuentran representados con mayor frecuencia (Bravo *et al.* 1998; Mahadeva Swamy *et al.* 2013; Uribe *et al.* 2003), algo similar a lo observado previamente en aislamientos de nuestro país (Alvarez *et al.* 2009; Berón y Salerno 2006; Sauka y Benintende 2017).

Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación por PCR de un fragmento del gen 16S rRNA utilizando los cebadores K1R y K1F para confirmar la identidad de los aislamientos de *B. thuringiensis* (ver ítem 6.3.3. - “Materiales y Métodos”). Luego de verificar el tamaño correcto de los amplicones en un gel de agarosa (Fig. 3.8), los mismos fueron secuenciados. El análisis primario de la similitud entre las secuencias de los nucleótidos obtenidos (Cuadro 3.8), y los depositados en la base de datos del GenBank utilizando el análisis BLAST, mostró que los aislamientos pertenecen a los Firmicutes clase Bacilli de la familia Bacillaceae y están relacionados con *B. thuringiensis* y otros miembros del Grupo *Bacillus cereus* por presentar un 100% de similitud.

Cuadro 3.8. Morfología de los cristales y número de acceso a las secuencias parciales de los genes 16S rRNA de los aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*.

Aislamiento	Tipo de cristal	Gen 16S rRNA N° de acceso GenBank
INTA L276-1	Ovoide	KR270788
INTA L276-5	Ovoide	KR270789
INTA L276-9	Ovoide	KR270790
INTA L276-10	Ovoide	KR270791
INTA L276-11	Ovoide	KR270792
INTA L277-5	Ovoide	KR270793
INTA L277-10	Ovoide	KR270794
INTA L280-4	Ovoide	KR270795

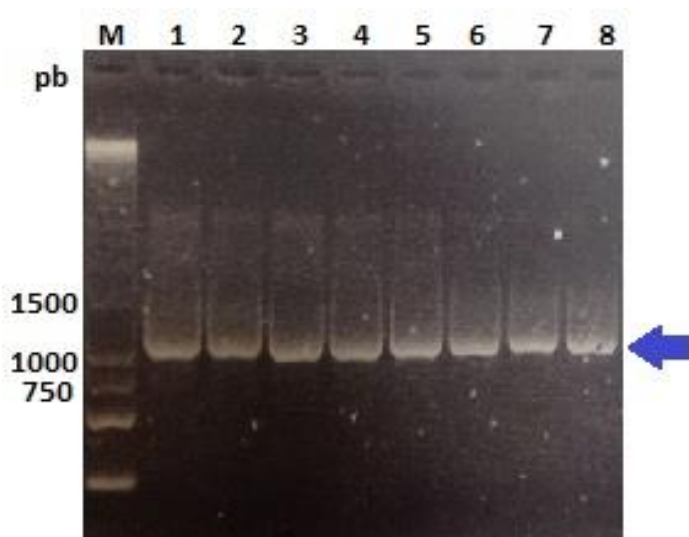


Fig. 3.8. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los amplicones de un fragmento del gen 16S rRNA. Líneas: 1, INTA L276-1; 2, INTA L276-5; 3, INTA L276-9; 4, INTA L276-10; 5, INTA L276-11; 6, INTA L277-5; 7, INTA L277-10; 8, INTA L280-4. La flecha indica las bandas que corresponden a 1114 pb. M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

Finalmente, se analizó el contenido proteico de los cristales de los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) (Fig. 3.9). Esta técnica se empleó para comparar los perfiles de los nuevos aislamientos con los de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 y svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 utilizadas como referencia. Ninguno de los aislamientos en estudio presentó un perfil idéntico al de las mismas. Se observó que la mayoría de los aislamientos nativos presentaron una banda de ca. 130 kDa (*B. thuringiensis* INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10 e INTA L276-11). Dicha banda también presente en la cepa HD-1, está asociada a un cristal de morfología bipiramidal (Sauka y Benintende 2008). Sin embargo, la presencia de proteínas de tamaño similar (ca. 130 kDa) en los aislamientos nativos no permitió relacionarlos directamente con la cepa de referencia, dado que no se observó la presencia de cristales bipiramidales durante la caracterización microscópica de los aislamientos. A su vez, se han reportado *B. thuringiensis* conteniendo una banda principal de ca. 130 kDa y cristales ovoides asociados a proteínas Cry8 o Cry9 con toxicidad para lepidópteros y coleópteros, o sólo lepidópteros respectivamente (Amadio *et al.* 2013; Sauka y Benintende 2017; Wasano y Ohba 1998). Los ensayos biológicos de toxicidad con larvas de estos tipos de insectos serán claves para determinar si la mencionada asociación se cumple en estos nuevos aislamientos.

Por otra parte, se observó que otros aislamientos presentaron bandas atípicas de ca. 180 kDa y otras bandas menores (*B. thuringiensis* INTA L277-5, INTA L277-10 e INTA L280-4). Este tamaño de banda no pudo asociarse con morfologías de cristales producidos por otras cepas conocidas con toxicidad para lepidópteros, coleópteros o dípteros (Carroll *et al.* 1989; Ibarra *et al.* 2003; Sauka y Benintende 2008). No obstante, estos aislamientos mostraron gran similitud con la cepa india *B. thuringiensis* LDC-391 reportada previamente (Poornima *et al.* 2010). La misma presentó cristales ovoides pequeños, bandas de 180, 85, 75 y 28 kDa en el SDS-PAGE, que no resultaron tóxicos para lepidópteros ni dípteros.

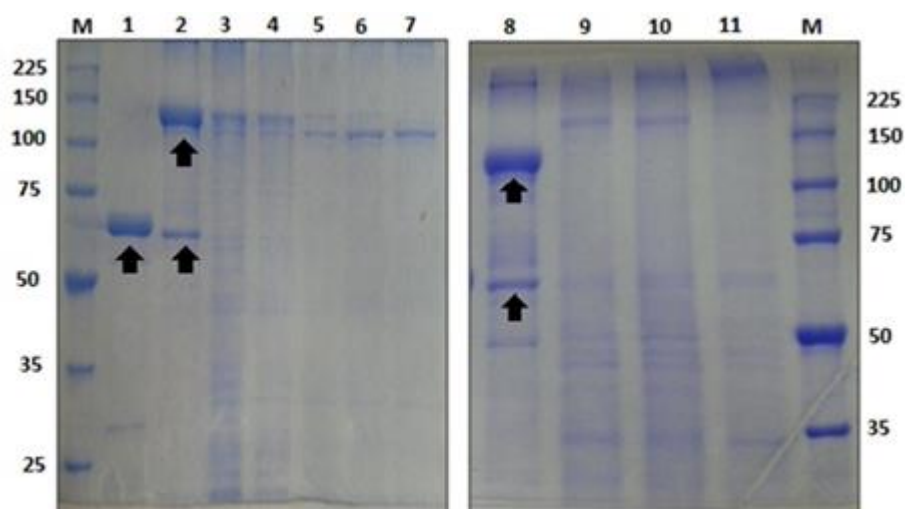


Fig. 3.9. Perfiles proteicos de los cristales de aislamientos nativos y cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis*. Líneas: 1, svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 2 y 8, svar. *kurstaki* HD-1; 3, INTA L276-1; 4, INTA L276-5; 5, INTA L276-9; 6, INTA L276-10; 7, INTA L276-11; 9, INTA L277-5; 10, INTA L277-10; 11, INTA L280-4. Las flechas indican las bandas que corresponden a 67 kDa (línea 1), 130 y 65 kDa (líneas 2 y 8) respectivamente. M: marcador de peso molecular “Broad Range Protein Molecular Weight Markers” (Promega).

2.1.1. Detección de genes de toxinas insecticidas Cry y Vip mediante amplificación génica.

Se procedió a identificar la identidad de genes de toxinas insecticidas presentes en los nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* mediante amplificación génica (PCR) y variantes (ver ítem 6.3 - “Materiales y métodos”). Por un lado, se procedió a la detección de genes *cry1*, *cry2* y *vip3A* asociados a proteínas tóxicas principalmente para insectos del Orden Lepidoptera. Se empleó la cepa *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 como referencia. Ninguno de los 8 aislamientos obtenidos en el presente estudio amplificó fragmentos de DNA correspondientes a los genes buscados (Fig. 3.10).

En los aislamientos nativos nuevos, se procedió también a la detección de genes *cry3*, *cry8*, *cry23*, *cry37*, *vip1* y *vip2* que codifican proteínas tóxicas principalmente para coleópteros. Las cepas *B. thuringiensis* svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 e INTA Fr7-4 se emplearon como referencias. Se obtuvo ausencia de amplificaciones para los genes *cry3*, *cry23*, *cry37*, *vip1* y *vip2*, mientras que en 5 aislamientos se detectó la presencia de una banda de ca. 930 pb, correspondiente al gen *cry8* (Fig. 3.11 y 3.12).

Para finalizar, se procedió a la detección de los genes *cry4*, *cyt1* y *cyt2* codificantes de proteínas tóxicas para mosquitos. Se empleó la cepa *B. thuringiensis* svar. *israelensis* HD-567 como referencia. Al igual que en otros de los casos anteriores, se observó que los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* en estudio resultaron negativos para las reacciones de amplificación (Fig. 3.13).

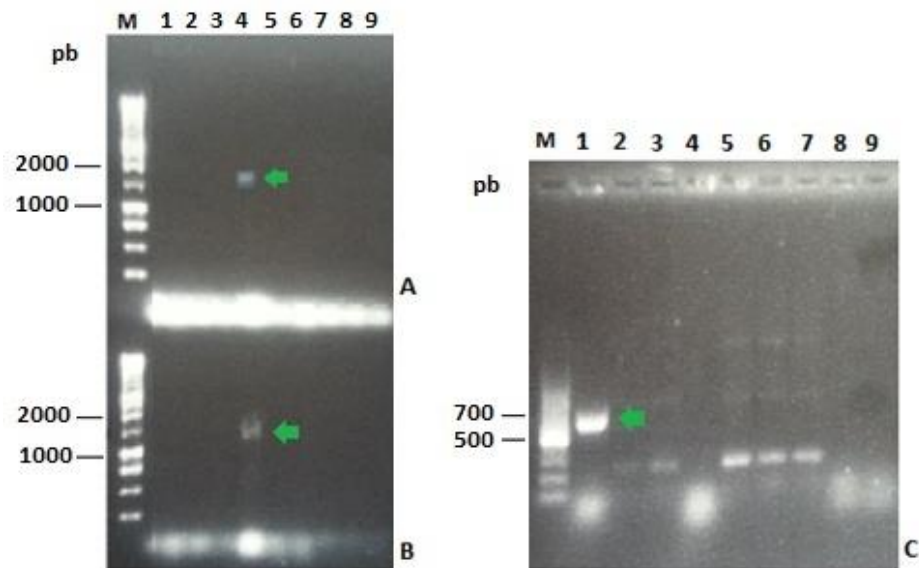


Fig. 3.10. Amplificación génica de *cry1* (A) y *cry2* (B). Líneas: 1, INTA L276-1; 2, INTA L276-5; 3, INTA L276-9; 4, svar. *kurstaki* HD-1; 5, INTA L276-10; 6, INTA L276-11; 7, INTA L277-5; 8, INTA L277-10; 9, INTA L280-4. Amplificación génica de *vip3A* (C). Líneas: 1, svar. *kurstaki* HD-1; 2, INTA L276-1; 3, INTA L276-5; 4, INTA L276-9; 5, INTA L276-10; 6, INTA L276-11; 7, INTA L277-5; 8, INTA L277-10; 9, INTA L280-4. Las flechas indican las bandas que corresponden a ca. 1500 pb (A y B), y 608 pb (C). M: marcador de peso molecular 1 Kpb (Inbio Highway).

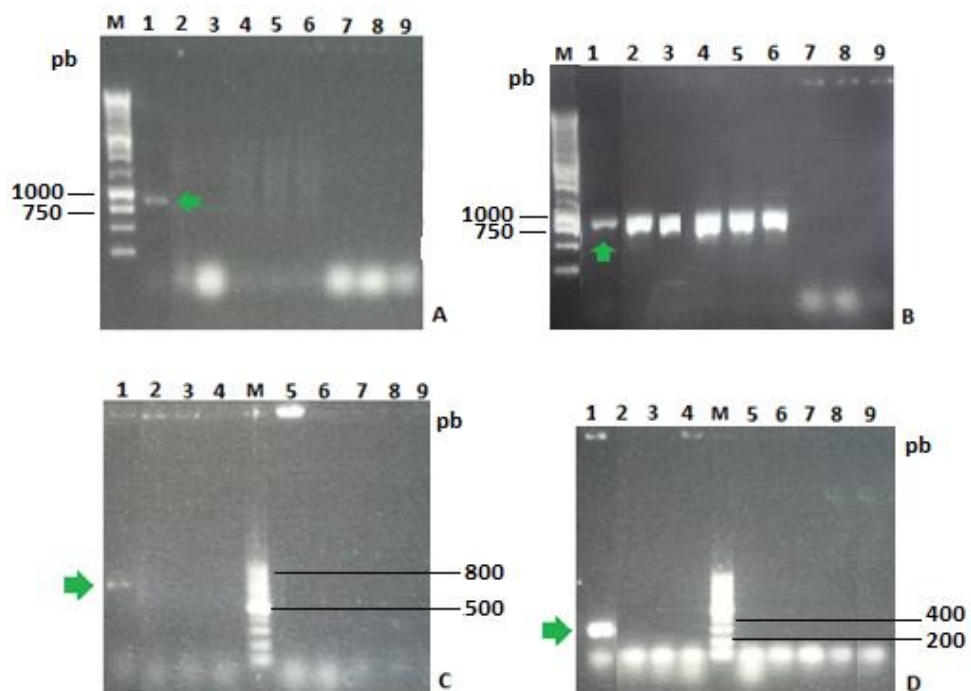


Fig. 3. 11. Amplificación génica de *cry3* (A), *cry8* (B), *cry23* (C) y *cry37* (D). Líneas: 1, svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803 (A, C y D) o INTA Fr7-4 (B); 2, INTA L276-1; 3, INTA L276-5; 4, INTA L276-9; 5, INTA L276-10; 6, INTA L276-11; 7, INTA L277-5; 8, INTA L277-10; 9, INTA L280-4. Las flechas indican las bandas que corresponden a 850 pb (A), ca. 930 pb (B), 702 pb (C) y 330 pb (D). M: marcador de peso molecular 1Kpb (Inbio Highway) (A y B) y 100 pb (Inbio Highway) (C y D).

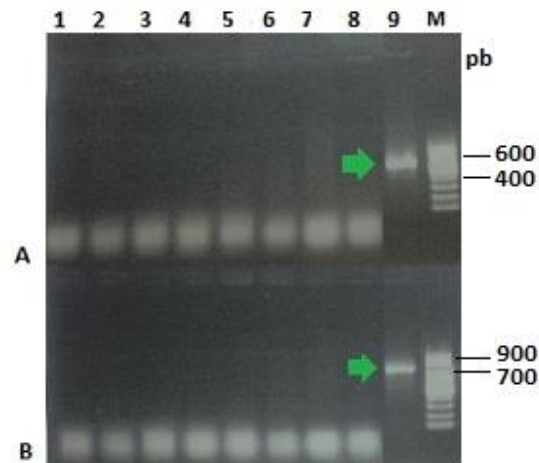


Fig. 3.12. Amplificación génica de *vip1* (A) y *vip2* (B). Líneas: 1, INTA L276-1; 2, INTA L276-5; 3, INTA L276-9; 4, INTA L276-10; 5, INTA L276-11; 6, INTA L277-5; 7, INTA L277-10; 8, INTA L280-4; 9, *svar. morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803. Las flechas indican las bandas que corresponden a 530 pb (A) y 826 pb (B). M: marcador de peso molecular 100 pb (Inbio Highway).

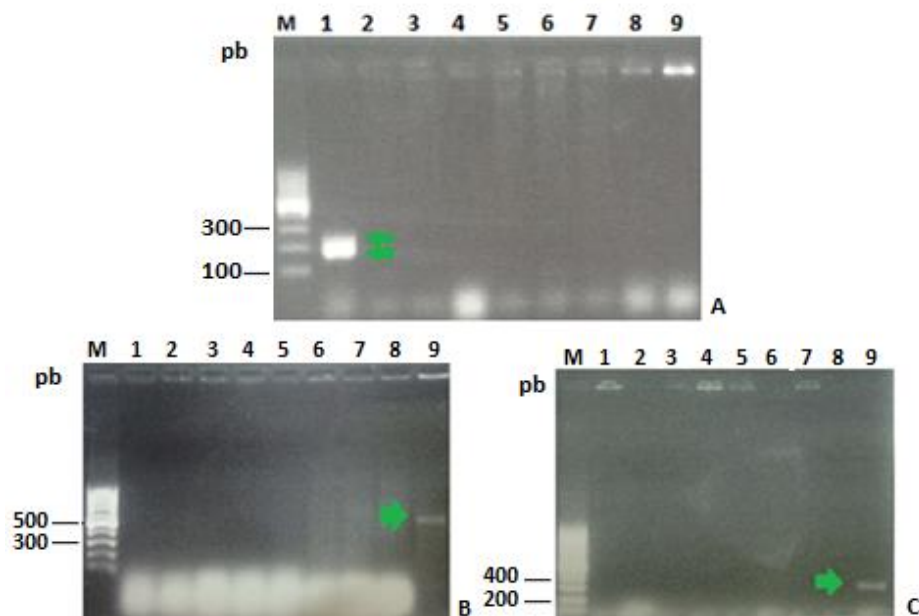


Fig. 3.13. Amplificación génica de *cry4* (A). Líneas: 1, *svar. israelensis* HD-567; 2, INTA L276-1; 3, INTA L276-5; 4, INTA L276-9; 5, INTA L276-10; 6, INTA L276-11; 7, INTA L277-5; 8, INTA L277-10; 9, INTA L280-4. Amplificación génica de *cyt1* (B) y *cyt2* (C). Líneas: 1, INTA L276-1; 2, INTA L276-5; 3, INTA L276-9; 4, INTA L276-10; 5, INTA L276-11; 6, INTA L277-5; 7, INTA L277-10; 8, INTA L280-4; 9, *svar. israelensis* HD-567. Las flechas indican las bandas que corresponden a 250 y 194 pb respectivamente (A), 470 pb (B), y 340 pb (C). M: marcador de peso molecular 100 pb (Inbio Highway).

La ausencia de amplificaciones con cebadores generales y específicos para la detección de los genes de toxinas insecticidas buscados, con excepción de algunos aislamientos para *cry8*, sugiere la ausencia de dichos genes en los aislamientos

analizados. Los cebadores utilizados en esta etapa, reconocen solo secuencias idénticas a la de genes reportados o con ligeras sustituciones. Por ello, variantes de los genes de toxinas insecticidas estudiados posiblemente no serían detectadas. Asimismo, se estudió solamente la presencia de los grupos de genes de toxinas insecticidas que se detectan con mayor frecuencia en *B. thuringiensis* y que codifican proteínas con toxicidad considerable para insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Reparando en el conocimiento de que existen actualmente 75 grupos de genes *cry*, 3 de *cyt* y 4 de *vip* reportados (Crickmore *et al.* 2018), es probable que estos aislamientos puedan ser portadores de genes de toxinas insecticidas no buscados durante este trabajo.

La detección de genes *cry8* en los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10 e INTA L276-1 fue consistente, como era de esperar, con la producción de cristales ovoides y una banda de *ca.* 130 kDa en el SDS-PAGE (Amadio *et al.* 2013; Sauka y Benintende 2017; Wasano *et al.* 1998).

2.1.2. Detección de genes que codifican otros metabolitos insecticidas o mejoradores de la actividad insecticida.

Se procedió a la detección de los genes *thuE* y *zmaA* que forman parte de los operones responsables de codificar la β -exotoxina de tipo I y zwittermicina A respectivamente. Las cepas *B. thuringiensis* svar. *thuringiensis* HD-2 y svar. *indiana* HD-521 se utilizaron como referencias. Se observó nuevamente en estos casos, que los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* en estudio resultaron negativos para las correspondientes reacciones de amplificación (Fig. 3.14). Estos resultados sugieren que estos aislamientos no serían productores de ninguno de los dos metabolitos mencionados.

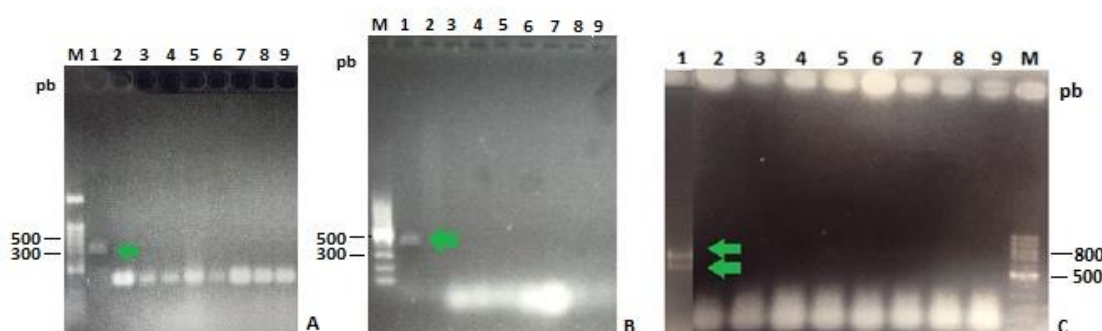


Fig. 3.14. Amplificación génica de *thuE* (A y B) y *zmaA* (C). Líneas: 1, svar. *thuringiensis* HD-2 (A y B) y svar. *indiana* HD-521 (C); 2, INTA L276-1; 3, INTA L276-5; 4, INTA L276-9; 5, INTA L276-10; 6, INTA L276-11; 7, INTA L277-5; 8, INTA L277-10; 9, INTA L280-4. Las flechas indican las bandas que corresponden a 385 (A), 406 pb (B), y 602 y 700 pb (C). M: marcador de peso molecular 100 pb (Inbio Highway).

2.2. Análisis de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* mediante Rep-PCR.

La clasificación de *B. thuringiensis* en 84 serovares es posible gracias a la serología del antígeno flagelar (H) (de Barjac y Franchon 1990; Xu y Côte 2006). Si bien constituye un método fiable, específico y sensible, presenta el inconveniente de que se necesita un gran número de anticuerpos para su implementación. Por ello, se describieron métodos alternativos de tipificación para aislamientos de *B. thuringiensis*,

casi todos basados en herramientas de biología molecular, con el objetivo de encontrar técnicas sustitutas más simples a la serotipificación flagelar que puedan mantener cierta correlación con esta última (Gaviria Rivera y Priest 2003; Reyes-Ramírez e Ibarra 2005). Dentro de estas técnicas, el análisis mediante Rep-PCR permitió establecer exitosamente una relación entre el serovar al que pertenece la cepa de *B. thuringiensis* en estudio y el patrón electroforético obtenido (Reyes-Ramírez e Ibarra 2005).

Para esta parte del trabajo se utilizaron los 8 aislamientos nativos de *B. thuringiensis* obtenidos. Además, se incluyeron las cepas lepidopteridas *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1, svar. *thuringiensis* HD-2 y svar. *aizawai* HD-137, las dipteridas svar. *israelensis* IPS-82, svar. *israelensis* HD-567, y la coleopterida svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 como cepas de referencia.

Se identificaron dos perfiles electroforéticos distintivos como resultado del análisis de estos aislamientos empleando Rep-PCR (Fig. 3.15). Ninguno de estos dos fue idéntico al de alguna de las cepas de referencia. Esto nos sugirió que estos aislamientos no pertenecerían a ninguno de los serovares analizados, de acuerdo con las conclusiones extraídas durante el desarrollo de esta técnica (Reyes-Ramírez e Ibarra 2005). El perfil de uno de estos grupos se asemejó al de la cepa coleopterida *B. thuringiensis* svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 utilizada como referencia.

Los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10, INTA L276-11 por un lado, e INTA L277-5, INTA L277-10, INTA L280-4 por otro, presentaron perfiles electroforéticos idénticos entre sí. Aquellos aislamientos que provenían de la misma muestra, que poseen los mismos genes codificantes de toxinas insecticidas y que demostraron un perfil electroforético idéntico podrían considerarse “gemelos”, ya que serían clones de la misma bacteria.

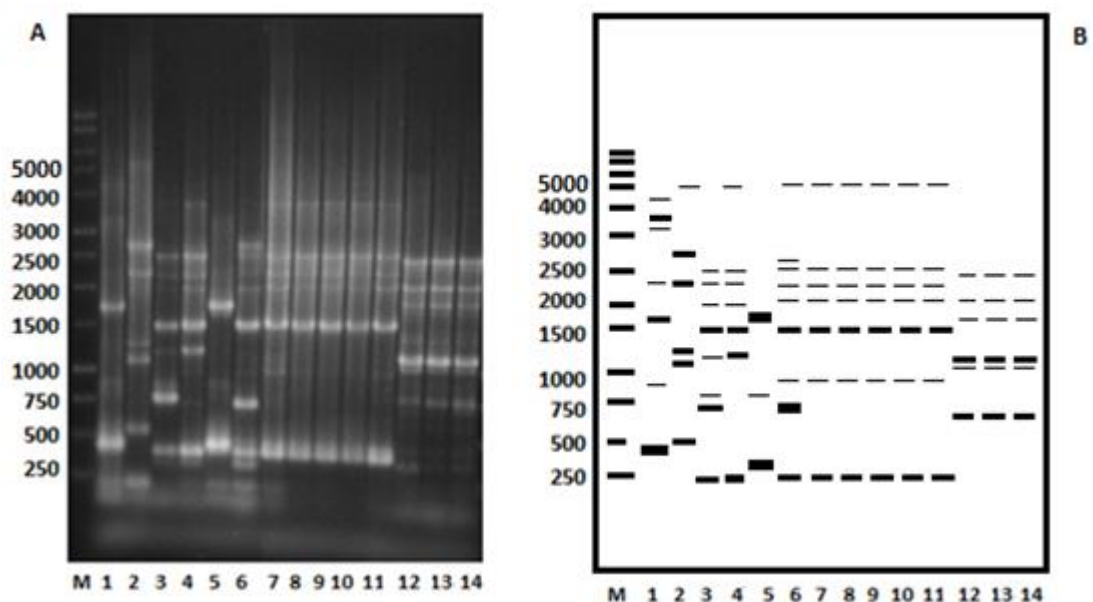


Fig. 3.15. Perfiles electroforéticos (A) y representación esquemática (B) de cepas de referencia y de los aislamientos nativos obtenidos mediante Rep-PCR. Líneas: 1, svar. *kurstaki* HD-1; 2, svar. *thuringiensis* HD-2; 3, svar. *israelensis* IPS82; 4, svar. *israelensis* HD-567; 5, svar. *aizawai* HD-137; 6, svar. *morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 7, INTA L276-1; 8, INTA L276-5; 9, INTA L276-9; 10, INTA L276-10; 11, INTA L276-11; 12, INTA L277-5; 13, INTA L277-10; 14, INTA L280-4. M: marcador de peso molecular 1 kb (Inbio Highway).

La diversidad de los perfiles electroforéticos de Rep-PCR observados sugirió una variabilidad genética baja entre los aislamientos de *B. thuringiensis* obtenidos de estos muestreos puntuales. Esta observación coincide con reportes previos sobre la diversidad de esta bacteria entomopatógena en Argentina que indicaban una baja diversidad en ellos (Basile 2008; Sauka *et al*, 2011; Sauka y Benintende 2017). Sin embargo, esto está en contraposición a lo representado en otras colecciones de *B. thuringiensis* de otros lugares del mundo donde se ha reportado una diversidad genética importante (Cherif *et al*, 2007; Reyes-Ramírez e Ibarra 2005; Zothansanga *et al*. 2016; Wang *et al*, 2003).

2.3. Análisis filogenético.

Para analizar las relaciones genéticas entre las distintas bacterias estudiadas, se confeccionó una matriz binaria basada en 18 bandas polimórficas identificadas a partir de los perfiles electroforéticos obtenidos por Rep-PCR comprendidas entre 0,25 y 4,0 kb de peso (Fig. 3.15). A partir de esta matriz, se llevó a cabo el correspondiente análisis de clusters por el método UPGMA, el cual brindó un único dendrograma (Fig. 3.16).

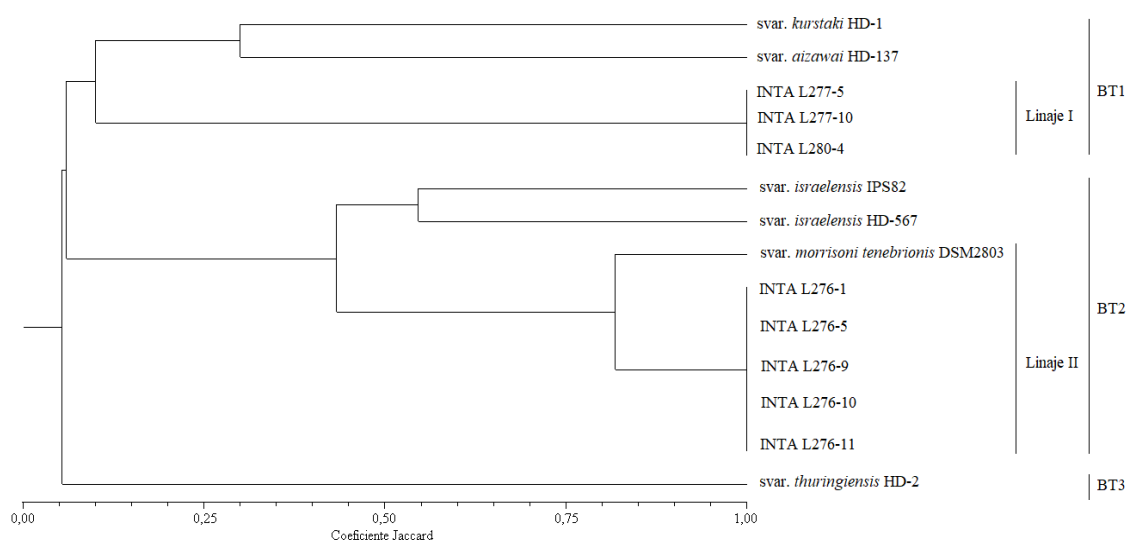


Fig. 3.16. Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de Rep-PCR generados a partir de aislamientos nativos y cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis*, utilizando el coeficiente de Jaccard y el método UPGMA.

En el dendrograma se evidenciaron tres grupos (BT1, BT2 y BT3). Del mismo modo, dentro de estos grupos se diferenciaron dos linajes principales establecidos en base a un mínimo del 75% de similitud. En el linaje I se incluyeron aislamientos nativos procedentes de dos larvas distintas de Mendoza. Los aislamientos INTA L277-5, INTA L277-10 e INTA L280-4 compartieron el mismo perfil electroforético, lo que se reflejó en un coeficiente de Jaccard de 1. En el linaje II, los aislamientos obtenidos de la muestra L276, también de Mendoza, y la cepa DSM2803 mostraron una similitud superior al 80%.

Se pudo notar en este estudio relaciones de parentesco entre los aislamientos nativos y ciertas cepas de *B. thuringiensis* empleadas como referencia y que se

caracterizan por una actividad tóxica específica para un determinado Orden de insectos. Esto se deduce del agrupamiento de ciertos aislamientos entorno a las cepas *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 y svar. *aizawai* HD-137 tóxicas para lepidópteros en el grupo BT1 y a *B. thuringiensis* svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 tóxica para coleópteros en el grupo BT2 (Linaje II).

Si bien no se detectó la presencia de genes de toxinas insecticidas o de genes codificantes de otros factores de virulencia conocidos en los aislamientos INTA L277-5, INTA L277-10 e INTA L280-4, sugiriendo que no serían tóxicos para lepidópteros, coleópteros o dípteros, no se debe descartar categóricamente la carencia de actividad insecticida de los mismos. Para avalar o descartar esta hipótesis sería necesario realizar ensayos biológicos de toxicidad donde se enfrenten los aislamientos en estudio y larvas de insectos pertenecientes a los órdenes mencionados. Como se mencionó párrafos arriba (ver sección 2.1.1. “Resultados y discusión”), podrían existir variantes no detectadas de los genes insecticidas analizados que podrían codificar proteínas con una actividad insecticida específica.

2.4. Evaluación de la actividad tóxica de los aislamientos nativos obtenidos para larvas de distintos órdenes de insectos.

Se realizó la evaluación toxicológica de suspensiones de *pellet* seco y molido de los 8 aislamientos de *B. thuringiensis* obtenidos mediante bioensayos “burdos” utilizando larvas de lepidópteros (*C. pomonella*) y dípteros (*A. aegypti*) (Cuadro 3.8). También se evaluaron los cultivos completos mediante el mismo tipo de bioensayos utilizando larvas de coleópteros (*Alphitobius diaperinus*) (Cuadro 3.9). *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1, svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 y svar. *israelensis* HD-567 se emplearon como controles positivo (Cuadro 3.9).

Cuadro 3.9. Toxicidad de los aislamientos nativos obtenidos y cepas de referencia para larvas de distintos órdenes de insectos.

Aislamiento/Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad (%) ¹ <i>C. pomonella</i>	Mortalidad (%) <i>A. diaperinus</i>	Mortalidad (%) <i>A. aegypti</i>
INTA L276-1	2,1±2,9 ^A	8,3±5,9 ^A	0,0±0,0
INTA L276-5	4,2±5,9 ^A	18,8±2,9 ^A	0,0±0,0
INTA L276-9	10,4±8,8 ^A	4,2±0,0 ^A	0,0±0,0
INTA L276-10	6,2±2,9 ^A	12,5±0,0 ^A	0,0±0,0
INTA L276-11	2,1±2,9 ^A	8,3±0,0 ^A	0,0±0,0
INTA L277-5	4,2±0,0 ^A	4,2±5,9 ^A	0,0±0,0
INTA L277-10	2,1±2,9 ^A	2,1±2,9 ^A	0,0±0,0
INTA L280-4	0,0±0,0 ^A	8,3±0,0 ^A	0,0±0,0
svar. <i>kurstaki</i> HD-1	66,7±5,9 ^B	ND ²	ND
svar. <i>morrisoni</i>	ND	41,7±11,8 ^B	ND
<i>tenebrionis</i> DSM2803			
svar. <i>israelensis</i> HD-567	ND	ND	100±0,0

¹Media ± DE. Valores de la media con distinta letra presentan diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ($p < 0,001$). ²ND, no determinado.

Ninguno de los aislamientos nativos resultó significativamente tóxico para *C. pomonella* ni *A. diaperinus*. Mostraron un nivel de actividad insecticida nulo a leve, reportando mortalidades comprendidas entre el 0,0% y el 10,4% para *C. pomonella* y entre el 2,1% y el 18,8% para *A. diaperinus*. La baja o nula toxicidad para *C. pomonella* era esperable, ya que los aislamientos provinieron de larvas vivas y sanas de la misma especie donde se evaluó su patogenicidad. Se podría hipotetizar que estos *B. thuringiensis* se encontraban en las larvas de donde se aislaron como saprófitos, y llegaron a ellas por estar en contacto con sus esporas libres o contenidas en su alimento habitual. Por otro lado, la baja toxicidad para *A. diaperinus* se pudo correlacionar claramente en los aislamientos obtenidos de la muestra L276 con la presencia de un cristal ovoide asociado a una proteína de ca. 130 kDa y genes *cry8*. Por otra parte, ninguno de los aislamientos tampoco produjo mortalidad, ni ningún efecto visible, sobre larvas de *A. aegypti*. Teniendo en cuenta que en los aislamientos no se detectaron genes de toxinas insecticidas asociadas con actividad dipterocida, era de esperar que los mismos no sean activos.

Las proteínas Cry8 se han descripto como tóxicas para coleópteros, por ejemplo para *Anthonomus grandis* B. (Navas *et al.* 2014), y principalmente para ciertos miembros de la familia Scarabaeidae (Asano *et al.* 2003; Shu *et al.* 2009), y para algunos lepidópteros como *Anticarsia gemmatilis* (Amadio *et al.* 2013). Por ello, los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10, INTA L276-11 podrían ser tóxicos para otras especies de coleópteros que no han sido aún evaluadas (por ejemplo, especies de escarabeídos). Sin embargo, para descartar o confirmar una actividad tóxica importante por parte de estos aislamientos nativos nuevos, sería necesario realizar nuevos ensayos biológicos de toxicidad donde se enfrenten los mismos y larvas de insectos pertenecientes a otras especies de los órdenes estudiados, incluso larvas de otros Filo como el Nematoda.

Para finalizar, la estrategia de aislamiento empleada resultó útil para la obtención de nuevos aislamientos de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de *C. pomonella* provenientes de zonas de producción.

▪ Resumen de los resultados obtenidos en la sección 2.

- La presencia de *B. thuringiensis* se identificó en un 9,4% (3/32) de las larvas vivas y sanas de *C. pomonella*, provenientes de dos regiones de Argentina libres de la aplicación de bioinsecticidas estudiadas.
- Las larvas a partir de las cuales se identificó *B. thuringiensis* brindaron entre 1 y 5 aislamientos, y compartieron el mismo lugar de procedencia
- Se obtuvieron 8 aislamientos que fueron identificados por la presencia de cristales parasporales y análisis de un fragmento del gen 16S rRNA.
- Se individualizaron cristales ovoides mediante microscopía de contraste de fases en todos ellos.
- El análisis de los cristales mediante SDS-PAGE brindó la existencia de una banda principal de ca. 130 kDa en *B. thuringiensis* INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10 e INTA L276-11, mientras que una de ca. 180 kDa y otras bandas menores en *B. thuringiensis* INTA L277-5, INTA L277-10 e INTA L280-4.
- Se obtuvo ausencia de amplificaciones para los genes de toxinas insecticidas estudiados en todos los aislamientos, a excepción de los genes *cry8* que fueron

identificados en los aislamientos INTA L276-1; INTA L276-5; INTA L276-9; INTA L276-10 e INTA 276-11.

- Los aislamientos INTA L276-1, INTA L276-5, INTA L276-9, INTA L276-10, INTA L276-11 por un lado, e INTA L277-5, INTA L277-10, INTA L280-4 por otro, presentaron perfiles electroforéticos idénticos entre sí.
- Ninguno de los aislamientos nativos resultó significativamente tóxico para *C. pomonella* ni *A. diaperinus*.
- Ninguno de los aislamientos produjo mortalidad, ni ningún efecto visible, sobre larvas de *A. aegypti*.

Sección 3: Selección de una cepa con alta actividad hacia larvas de *Cydia pomonella* análisis de los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.

La importancia que presenta investigar cepas nativas de *B. thuringiensis*, radica en que son propias del ecosistema argentino, cosa que no acontece al utilizar cepas exóticas para el control de insectos plaga, ya que las mismas responden a condiciones existentes en el medioambiente del que fueron aisladas. Por ende, era de esperar que este estudio permitiese la selección de cepas nativas con cualidades destacadas desde el punto de vista de los bioinsecticidas.

Se realizó un estudio de tamizaje empleando la biomasa, compuesta por el *pellet* seco y molido mencionado anteriormente, de cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* en búsqueda de aquellas patógenas para larvas de *C. pomonella*. Una vez seleccionadas las cepas más tóxicas, las mismas se caracterizaron fenotípica y genotípicamente. A continuación, se estableció la virulencia a través de la estimación de la concentración letal media (CL₅₀). También se evaluó cómo influyen la solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales en la virulencia de ciertas cepas.

Por último se seleccionó un medio de cultivo líquido para la producción de una de las cepas en particular con el objeto de lograr una mayor biomasa activa. Esto resulta de importancia para el desarrollo futuro de un bioinsecticida.

3.1. Tamizaje de cepas tóxicas para larvas de *Cydia pomonella*.

Se determinó la patogenicidad de 73 cepas nativas y 12 cepas exóticas (detalladas en los cuadros 2.1 y 2.2 - “Materiales y métodos”) de *B. thuringiensis* mediante bioensayos “burdos” utilizando una concentración final de biomasa (mezcla de esporas y cristales) de 5 µg/ml de dieta utilizando larvas neonatas de *C. pomonella* (Cuadro 3.10 y 3.11). Las 85 cepas en total evaluadas demostraron un nivel variable de toxicidad frente a dicha plaga. Se registraron mortalidades comprendidas de 0% a 95,8% y de 10,4% a 83,0% en las cepas nativas y exóticas de *B. thuringiensis* respectivamente.

Cuadro 3.10. Actividad tóxica de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Cydia pomonella*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad¹ (%)	Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad¹ (%)
INTA 3-1	70,8±0,0	INTA Mo23-2	79,2±5,9
INTA 7-3	81,3±8,8	INTA Mo26-1	75,0±5,9
INTA 77-10	0,0±0,0	INTA Mo27-1	70,8±11,8
INTA 78-2	66,7±5,9	INTA Mo28-4	85,4±20,6
INTA 79-37	83,3±0,0	INTA Mo29-1	81,2±2,9
INTA 79-38	29,2±5,9	INTA H1-1	77,1±8,8
INTA Ep-2	90,7±0,0	INTA H1-2	75,0±11,8
INTA Fo3-2	79,2±5,9	INTA H2-5	77,1±2,9
INTA Fr7-4	6,2±2,9	INTA H2-12	54,4±6,2
INTA L1-2	79,2±11,8	INTA H3-2	79,2±5,9
INTA L2-1	43,7±2,9	INTA H3-3	58,3±11,8
INTA L14-2	81,3±8,8	INTA H3-5	66,7±0,0
INTA L93-3	93,8±2,9	INTA H4-1	77,1±14,7
INTA 50-4	6,2±2,9	INTA H4-3	68,7±2,9
INTA 54-8	95,8±0,0	INTA H5-2	89,6±8,8
INTA 56-4	27,1±2,9	INTA H5-5	77,1±8,8
INTA Mo1-7	95,8±5,9	INTA H6-3	77,1±2,9
INTA Mo1-10	64,6±2,9	INTA H7-3	3,1±1,2
INTA Mo1-12	41,7±0,0	INTA H11-4	89,6±8,8
INTA Mo4-6	10,4±2,9	INTA H12-5	95,8±5,9
INTA Mo5-8	91,7±0,0	INTA H13-5	16,7±11,8
INTA Mo8-1	77,1±8,8	INTA H14-1	93,6±2,9
INTA Mo8-2	85,4±8,8	INTA H17-5	70,8±0,0
INTA Mo9-1	89,6±8,8	INTA H22-2	81,2±20,6
INTA Mo9-5	16,7±5,9	INTA H42-1	89,6±2,9
INTA Mo14-1	87,5±11,8	INTA H45-4	75,0±5,9
INTA Mo14-2	68,7±2,9	INTA H46-12	68,8±8,8
INTA Mo14-3	75,0±17,7	INTA H46-18	91,7±0,0
INTA Mo15-2	77,1±8,8	INTA H47-2	83,3±0,0
INTA Mo17-1	68,7±2,9	INTA H48-5	75,0±11,8
INTA Mo22-4	79,2±5,9	INTA H48-6	60,4±14,7
INTA TA1-11	75,0±0,0	INTA H48-8	93,6±2,9
INTA TA1-13	81,3±8,8	INTA H48-34	75,0±5,9
INTA TA20-6	64,6±14,7	INTA Pol49-6	87,5±5,9
INTA TA21-2	50,0±0,0	INTA VO3	85,4±2,9
INTA TA24-2	87,5±5,9		
INTA TA24-6	6,3±8,8		
INTA TA24-10	64,6±20,6		

¹Media ± DE.

Se obtuvieron 9 cepas nativas y 4 exóticas que demostraron una mortalidad menor al 30%, 3 y 6 entre 30 y 50%, y 61 y 2 mayor al 50%.

Los datos de mortalidad obtenidos en este estudio para cepas nativas de *B. thuringiensis* revelan un elevado poder patogénico de las mismas contra la Carpocapsa.

Las cinco cepas nativas que resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella* fueron *B. thuringiensis* INTA H12-5, INTA Mo1-7, INTA 54-8, INTA L93-3, e INTA H42-1, con mortalidades del 95,8%, 95,8%, 95,8%, 93,7% y 89,6% respectivamente (Cuadro 3.10). Las mismas fueron seleccionadas para estudios posteriores.

Cuadro 3.11. Actividad tóxica de cepas exóticas de *Bacillus thuringiensis* para larvas de *Cydia pomonella*.

Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad ¹ (%)	Cepa de <i>B. thuringiensis</i>	Mortalidad ¹ (%)
<i>aizawai</i> HD-137	54,2±0,0	<i>kurstaki</i> HD-73	43,5±0,0
<i>entomocidus</i> HD-110	43,7±2,9	<i>morrisoni tenebrionis</i> DSM2803	10,4±8,9
<i>galleriae</i> T05001	50,0±0,0	<i>thompsoni</i> HD-542	43,8±8,8
<i>israelensis</i> IPS-82	10,4±2,9	<i>thuringiensis</i> HD-2	41,7±5,9
<i>kumamotoensis</i> HD-867	16,7±0,0	<i>tochigiensis</i> HD-868	10,4±2,9
<i>kurstaki</i> HD-1	83,0±5,9	<i>tolworthi</i> HD-125	50,0±5,9

¹Media ± DE.

Ninguna de las cepas exóticas de *B. thuringiensis* resultó más tóxica en este estudio de tamizaje que las cinco cepas nativas seleccionadas. La cepa exótica HD-1 perteneciente al serovar *kurstaki* resultó la más tóxica (Cuadro 3.11).

Contrariamente a lo observado en esta tesis (Cuadro 3.11), Andermatt *et al.* (1998) observaron que *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-73 resultó 2 veces más tóxica para *C. pomonella* que HD-1. Como fue discutido en el ítem 1.2.1, esta disparidad podría también ser debida principalmente a diferencias genéticas entre las poblaciones de insectos plaga que se comparan (en este caso la *Carpocapsa* argentina respecto a una población europea), que determinan cambios en la susceptibilidad a distintas proteínas insecticidas (Monnerat *et al.* 2006, Tabashnik *et al.* 1997). No obstante, es sabido que HD-73 presenta únicamente el gen *cry1Ac* (Wilks *et al.* 1998), mientras que svar. *kurstaki* HD-1 los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa*, *cry2Ab* y *vip3Aa* (Zhu *et al.* 2015). Como se vió en el cuadro 3.3, la proteína Cry1Ac mostró una baja actividad insecticida, y a su vez, significativamente más baja que Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ia y Cry2Aa en las condiciones ensayadas. Por lo tanto, las diferencias observadas durante este estudio entre los porcentajes de mortalidad de HD-73 y HD-1 no resultarían ilógicas. De igual modo, la baja actividad insecticida de Cry1Ac se correlacionó con este mismo nivel de actividad insecticida presentado por la cepa nativa INTA TA24-6 (Cuadro 3.10). Esta cepa se caracterizó por portar los genes *cry1Ac* y *cry2Ab*, de los cuales, este último es críptico (Sauka *et al.* 2010).

Algunos investigadores han indicado la eficacia de un producto que contiene una cepa de *B. thuringiensis* svar. *aizawai* como ingrediente activo para el control de la *Carpocapsa* (Cichón *et al.* 2013). Aunque desconocemos la cepa de ese serovar utilizada para la elaboración de tal bioinsecticida, pero considerando que HD-1 (svar. *kurstaki*) resultó más tóxico que la cepa HD-137 (svar. *aizawai*), podríamos pensar en la posibilidad de que el control de *C. pomonella* con *B. thuringiensis* podría ser mejorado.

3.2. 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 *C. pomonella* se presentan en el cuadro 3.12.

Cuadro 3.12. Principales características fenotípicas y genotípicas de las cepas nativas más tóxicas.

Cepa	Morfología de cristales	Perfil proteico (kDa)	Perfil de genes <i>cry</i> y <i>vip</i>
INTA L93-3	bipiramidal y cúbico	ca. 130 y 65	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA Mo1-7	bipiramidal y cúbico	ca. 130 y 65	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA 54-8	bipiramidal y cúbico	ca. 130 y 65	<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA H12-5	bipiramidal y cúbico	ca. 130 y 65	<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab</i> y <i>vip3Aa</i>
INTA H42-1	bipiramidal y cúbico	ca. 130 y 65	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac</i> y <i>cry2Aa</i>

Bacillus thuringiensis INTA H12-5, INTA L93-3, INTA 54-8, INTA H42-1 e INTA Mo1-7 mostraron compartir una morfología similar de cristales de acuerdo a lo determinado mediante microscopía de contraste de fases, cristales con perfiles proteicos similares según lo revelado por SDS-PAGE (Fig. 3.17A), pero distintos perfiles de genes de toxinas insecticidas (Sauka y Benintende 2017). Estas cepas producen cristales bipiramidales y cúbicos y proteínas principales de ca. 130 y 65 kDa, consistentes con la presencia de genes *cry1* y *cry2* (Sauka y Benintende 2008). En cuanto a genes de toxinas insecticidas (Cuadro 3.12), INTA L93-3 e INTA Mo1-7 por un lado, e INTA 54-8 e INTA H12-5 por otro, presentaron perfiles similares que difirieron en solo un gen respectivamente. La cepa nativa INTA H42-1 difirió de los anteriores y presenta un perfil atípico que, de acuerdo a nuestro conocimiento, no se ha observado en otra cepa de *B. thuringiensis* publicada (Sauka y Benintende 2017).

Todas estas características de las cepas tóxicas para la Carpocapsa se asemejan bien a caracteres de cepas de *B. thuringiensis* claramente establecidas como lepidopterocidas (Sauka y Benintende 2008). Asimismo, esta afirmación se ve fortalecida en que estas cepas mostraron perfiles electroforéticos de Rep-PCR idénticos a la cepa HD-1 utilizada como referencia (Fig. 3.17B), lo que sugirió además, 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). En forma complementaria, se realizó un dendrograma que confirma estos resultados (Fig. 3.18).

Bacillus thuringiensis svar. *kurstaki* HD-1 es la cepa más utilizada como ingrediente activo de insecticidas biológicos para el control de insectos lepidópteros que afectan la agricultura y la actividad forestal (Sauka y Benintende 2008). Esta cepa presenta los genes *cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac, cry1Ia, cry2Aa, cry2Ab* y *vip3Aa* (Zhu *et al.* 2015), un perfil génico idéntico, o prácticamente idéntico, al de las cinco cepas nativas (Cuadro 3.12). Se destaca en INTA H42-1 un perfil de genes de toxinas insecticidas

característico y distintivo al de otras cepas descritas hasta ahora (Sauka y Benintende, 2017). Carece de los genes *cry1Ia*, *cry2Ab* y *vip3Aa*, los cuales se hallan fuertemente ligados genéticamente a genes *cry1A* y *cry2Aa* (Sauka y Benintende 2017). Cuando se determinó el perfil de plásmidos, se obtuvieron los siguientes resultados: INTA 54-8 e INTA H12-5 por un lado e INTA L93-3, INTA Mo1-7 e INTA H42-1 presentaron los mismos perfiles plasmídicos respectivamente (Fig. 3.17D). En términos generales ninguna cepa seleccionada se diferenció del perfil de HD-1 (Fig. 3.17D).

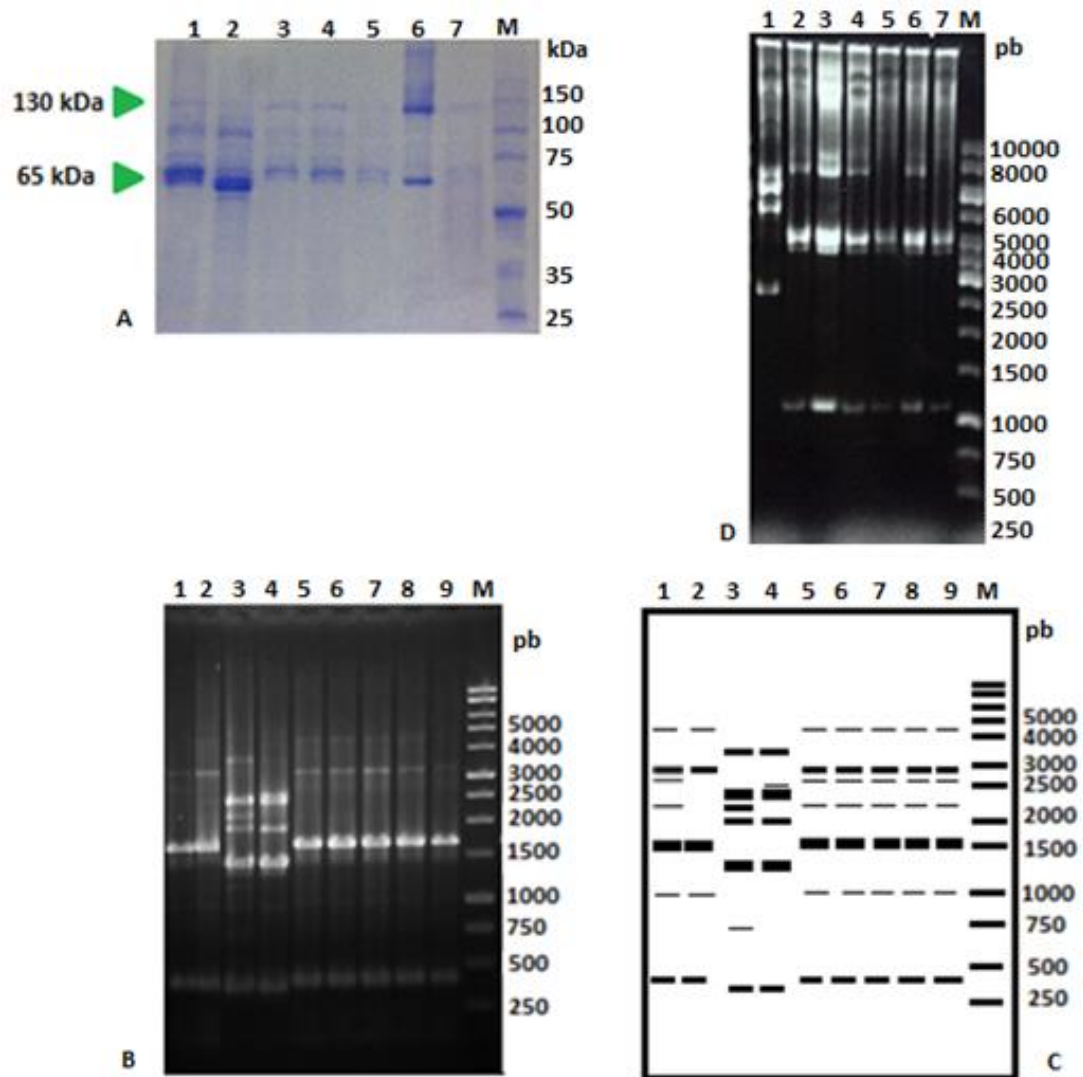


Fig. 3.17. Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas. (A): Análisis electroforético de las proteínas que forman los cristales. Líneas: 1, INTA H12-5; 2, INTA L93-3; 3, INTA 54-8; 4, INTA H42-1; 5, INTA Mo1-7; 6, *svar. kurstaki* HD-1; 7, *svar. aizawai* HD-137; M: marcador de peso molecular “Broad Range Protein Molecular Weight Markers” (kDa) (Promega). (B): Perfil electroforético obtenido mediante Rep-PCR y (C): Representación esquemática; Líneas: 1, *svar. kurstaki* HD-1; 2, *svar. aizawai* HD-133; 3, *svar. israelensis* HD-567; 4, *svar. morrisoni* cepa *tenebrionis* DSM2803; 5, INTA L93-3; 6, INTA Mo1-7; 7, INTA H12-5; 8, INTA 54-8; 9, INTA H42-1. (D): Perfiles de plásmidos. Líneas: 1, *svar. aizawai* HD-137; 2, *svar. kurstaki* HD-1; 3, INTA H42-1; 4, INTA L93-3; 5, INTA 54-8; 6, Mo1-7; 7, INTA H12-5. M: marcador de peso molecular 1 kpb (Inbio Highway).

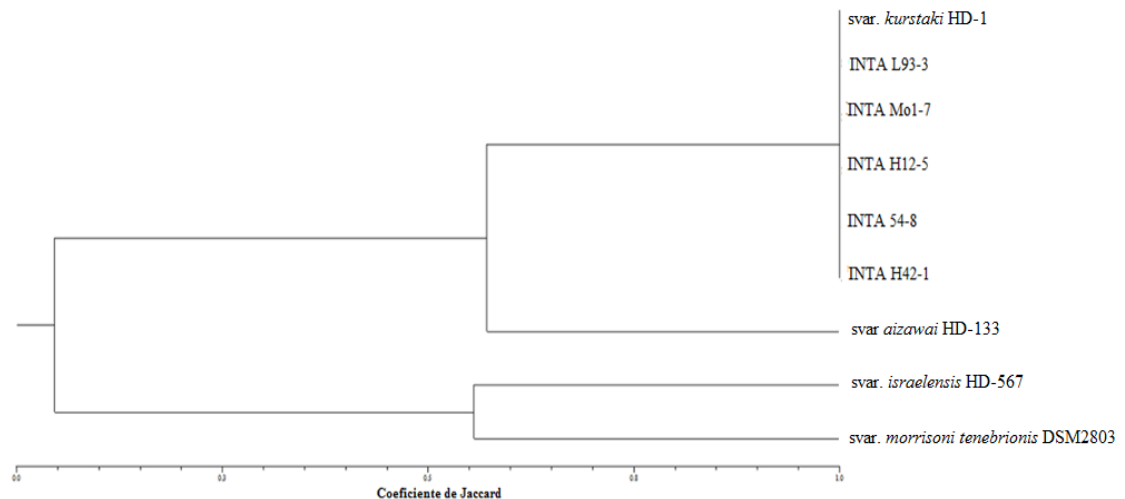


Fig. 3.18. Dendrograma estimado de los perfiles electroforéticos de Rep-PCR obtenidos de cepas de referencia y nativas seleccionadas de *Bacillus thuringiensis*.

Finalmente se evaluó la presencia del gen *thuE* asociado a la síntesis de β -exotoxina. Se observó que los aislamientos nativos de *B. thuringiensis* en estudio resultaron negativos para las correspondientes reacciones de amplificación (Fig. 3.19). Esto sugiere que ninguna de estas cepas sería productora de β -exotoxina, por lo que se descartaría su rol en la patogenicidad para *C. pomonella* (Sauka *et al.* 2014).

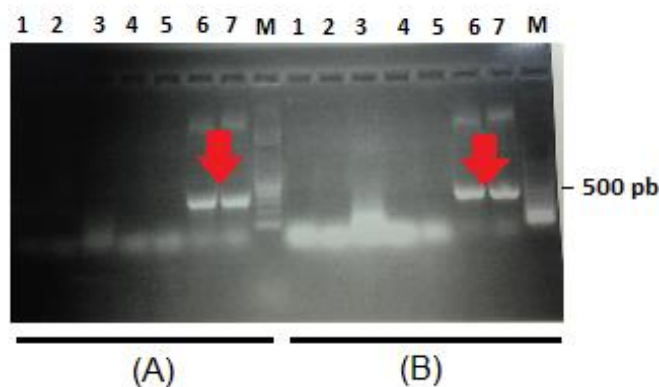


Fig. 3.19. Amplificación génica de *thuE*. (A y B) Líneas: 1, INTA L93-3; 2, INTA Mo1-7; 3, INTA H12-5; 4, INTA 54-8; 5, INTA H42-1; 6, *thuringiensis* HD-2; 7, INTA H48-5. Las flechas indican las bandas que corresponden a 384 pb (A: líneas: 6 y 7, *thuringienis* HD-2 e INTA H48-5) y 406 pb (B: líneas: 6 y 7, *thuringiensis* HD-2 e INTA H48-5). M: marcador de peso molecular 100 pb (Inbio Highway).

3.3. Bioensayos “finos” con *Cydia pomonella*.

3.3.1. Cuantificación de la virulencia de cepas tóxicas para *Cydia pomonella* mediante estimación de la concentración letal media.

Las cinco cepas nativas de *B. thuringiensis* que resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella* fueron seleccionadas para ser analizadas en bioensayos “finos”. Se

evaluaron seis concentraciones de cada preparación (suspensiones de *pellet* seco y molido) comprendidas entre 0,9 y 9 µg/ml de dieta larval (factor de dilución: 0,625), para la estimación de la CL₅₀ y de otros parámetros estadísticos (Cuadro 3.13).

Teniendo en cuenta los valores de CL₅₀ obtenidos, las cepas nativas INTA H12-5 e INTA L93-3 resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella*, incluso más tóxicas que la cepa exótica *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1. No obstante, las diferencias entre ellas no fueron estadísticamente significativas (Cuadro 3.13). Estas tres cepas presentaron un perfil de genes de toxinas insecticidas similar, careciendo INTA H12-5 del gen *cry1Ab* (Cuadro 3.12) (Zhu *et al.* 2015). Tomando en consideración estos resultados, los datos de mortalidad y perfiles génicos de las otras cepas seleccionadas, se pudo observar que cepas con idéntico perfil génico difirieron considerablemente en su acción insecticida. Por ejemplo, las cepas INTA L93-3 e INTA Mo1-7 presentaron los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ia*, *cry2Aa* y *cry2Ab*, pero INTA L93-3 un grado de virulencia significativamente mayor que INTA Mo1-7. Este mismo tipo de observaciones donde cepas con perfiles de genes de toxinas insecticidas idénticos o similares mostraron diferencias en la acción insecticida, también fueron descritas por otros autores en otras especies de insectos distintas a *C. pomonella* (Hongyu *et al.* 2000; Martínez *et al.* 2005; Sauka y Benintende 2017). Las razones para estas variaciones no son claras, pero podrían relacionarse con factores que incluyen: los niveles de expresión de los genes de toxinas insecticidas, posibles interacciones entre las proteínas que estos codifican, como también la posible presencia de otros metabolitos insecticidas no detectados o conocidos hasta el momento.

Liu *et al.* (2013) reportaron para HD-1 un nivel de virulencia significativamente menor al obtenido durante este estudio (Cuadro 3.13). Ellos ensayaron concentraciones de protoxina a través de bioensayos de alimentación inducida, informando una CL₅₀ de 15,7 µg/ml en larvas de 3er estadio de *C. pomonella*. Si bien la preparación del material tóxico y el tipo de bioensayo empleado son factores que pueden influenciar en los resultados de los bioensayos, en este caso las discrepancias se explicarían por el mayor grado de desarrollo de las larvas utilizadas (McLaughlin *et al.* 1984).

Por otra parte, cabe destacar que HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* y todas las cepas nativas seleccionadas resultaron entre 1 y 3 veces más tóxicas que HD-137 perteneciente al svar. *aizawai*, remitiendo a esta última como la peor opción en cuanto a su elección para destinarla al control eficiente de *C. pomonella* (Cuadro 3.13).

Se conoce que *B. thuringiensis* svar. *aizawai* HD-133, cepa muy similar a HD-137, posee un perfil de genes de toxinas insecticidas diferente al de HD-1 (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ca*, *cry1Da*, *cry1Ia*, *cry2Ab* y *cry9Ea*) (Fu *et al.* 2017), de los cuales solo *Cry1Ab*, *Cry1Ca* y *Cry1Da* se expresarían formando cristales (Masson *et al.* 1998). Konecka *et al.* (2015) reportaron que *B. thuringiensis* MPU B9, una cepa que presenta un perfil génico similar a HD-133 (*cry1Aa*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1I*, *cry2Ab*, *cry9B* y *cry9E*), resultó significativamente más activa que la cepa HD-1 en *C. pomonella*. En este caso, esta mayor actividad insecticida por parte de MPU B9 se asoció principalmente con la presencia de *Cry1B*, *Cry1C*, *Cry1D* y *Cry9*. Evidentemente este tipo de proteínas que estarían presentes en HD-137, pero ausentes en HD-1, no jugarían un papel tan relevante en la actividad insecticida sobre la población nativa de *C. pomonella* utilizada en este estudio.

Por lo expuesto hasta ahora, *B. thuringiensis* INTA H12-5 podría considerarse como la mejor opción como ingrediente activo de un formulado nativo nuevo de alta toxicidad para *C. pomonella*, considerando la utilización de recursos genéticos nativos

de aplicación regional. Otra de las cepas a tener en cuenta es INTA H42-1, debido a que su toxicidad resultó similar a la de HD-1 y a que adicionalmente presenta variaciones en su perfil de genes de toxinas insecticidas. Esta última característica podría ser utilizada para su diferenciación, y eventualmente, ser ventajosa ante una situación de desarrollo de resistencia por parte de esta plaga.

Cuadro 3.13. Análisis Probit de las cepas exóticas y nativas más tóxicas para larvas neonatas de *Cydia pomonella*.

Cepa	CL ₅₀ ¹ (µg/ml)	CV ²	CL ₉₀ ³ (µg/ml) ³	Pendiente	χ ² (4 gl) ⁴
<i>kurstaki</i> HD-1	1,5 [1,0-2,0]	0,20	7,6 [5,0-17,0]	1,8	1,8
	1,5 [1,1-2,0]		6,1 [4,4-11,4]	2,1	1,5
	2,1 [1,4-2,4]		7,5 [5,2-14,2]	2,1	1,6
Media⁵	1,7^A		7,1		
<i>aizawai</i> HD-137	3,1 [2,1-4,7]	0,12	25,6 [12,2-167,6]	1,4	4,3
	3,8 [2,4-5,8]		39,3 [18,0-252,5]	1,3	0,3
	3,9 [2,7-5,7]		30,6 [15,8-124,2]	1,4	4,2
Media	3,6^B		31,8		
INTA H12-5	1,3 [1,0-2,0]	0,14	6,7 [3,7-24,5]	1,8	3,1
	1,3 [1,0-1,8]		5,7 [3,3-17,2]	1,9	1,2
	1,0 [0,8-1,2]		3,3 [2,3-4,7]	2,4	1,9
Media	1,2^{A, C, E}		5,2		
INTA L93-3	1,6 [1,1-2,0]	0,18	5,9 [4,2-10,4]	2,2	1,8
	1,4 [0,9-1,8]		5,7 [4,0-10,6]	2,1	0,3
	1,1 [0,7-1,5]		4,4 [3,2-7,8]	2,1	5,2
Media	1,4^{A, C, E}		5,3		
INTA 54-8	2,0 [1,5-2,5]	0,18	7,1 [5,1-12,8]	2,3	2,3
	1,4 [1,0-1,8]		4,9 [3,6-8,3]	2,3	1,4
	1,8 [1,3-2,3]		7,0 [5,0-13,1]	2,2	1,1
Media	1,7^{A, C, E, G}		6,4		
INTA H42-1	2,5 [1,9-3,2]	0,14	9,4 [6,5-18,1]	2,2	0,6
	1,9 [1,2-2,6]		11,5 [6,9-34,7]	1,6	2,0
	2,2 [1,7-2,9]		8,7 [6,0-16,6]	2,2	3,0
Media	2,2^{A, D, E, G, I}		9,9		
INTA Mo1-7	2,4 [1,7-3,2]	0,19	11,8 [7,5-29,4]	1,8	0,8
	3,5 [2,6-4,8]		18,8 [11,6-45,9]	1,8	4,6
	2,8 [1,9-4,0]		20,2 [11,5-64,3]	1,5	2,4
Media	2,9^{B, D, F, H, I}		16,9		

¹Concentración letal media y límites de confianza del 95%; ²Coeficiente de variación; ³Concentración letal 90% y límites de confianza del 95%; ⁴Chi-cuadrado con 4 grados de libertad; ⁵Media, promedio de tres repeticiones. Valores de la media con distinta letra presentan diferencias significativas de acuerdo al Test de Tukey ($p < 0,05$).

3.3.2. Efecto de la solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales de dos cepas nativas seleccionadas sobre la actividad tóxica para *Cydia pomonella*.

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). Para determinar si la administración de la protoxina previamente procesada producía algún efecto en la actividad tóxica, se cuantificó la virulencia del *pellet* seco y molido de INTA H12-5 e INTA H42-1 para *C. pomonella* sometido a un proceso de solubilización (S), y de solubilización y posterior digestión con tripsina (ST) *in vitro* (Cuadro 3.14). Luego, se compararon los valores de CL_{50} obtenidos entre sí realizando una prueba *t* de Student. De este análisis surgió que existían diferencias significativas entre los distintos tratamientos para INTA H12-5 ($t = 4,33$; $p = 0,049$) e INTA H42-1 ($t = 5,12$; $p = 0,007$) (Cuadro 3.14). Estas observaciones sugerirían que *C. pomonella* no posee las enzimas y/o los niveles adecuados de las mismas para el procesamiento completo de las proteínas Cry en el intestino medio, por lo que no permitirían la expresión máxima de la actividad insecticida de este entomopatógeno. El papel de las proteasas intestinales influyendo en los niveles de susceptibilidad a proteínas Cry se puso por primera vez de manifiesto en *Plodia interpunctella* H. (Lepidoptera: Pyralidae). Se encontró que los insectos menos sensibles activaban más lentamente la proteína Cry1Ac que los más susceptibles y que ello se debía a que los primeros carecían de una tripsín-proteasa en su intestino, hipotéticamente involucrada en el procesamiento de las proteínas Cry (Oppert *et al.* 1994; Oppert *et al.* 1997).

Si bien no fue objeto de estudio la comparación de la virulencia de los tratamientos parciales (S) (Cuadro 3.14), y la de las suspensiones de *pellet* seco y molido sin tratar (Cuadro 3.13), son llamativas las diferencias observadas entre ambas. El mayor grado de virulencia de estos últimos con respecto al de los S podría deberse a menores niveles de proteínas Cry ingeridas por la larva. Se han reportado casos en donde luego de la solubilización, la actividad tóxica de los cristales se reduce drásticamente (Chilcott y Ellar 1988; Insell y Fitz-James 1985; Visser *et al.* 1986).

Cuadro 3.14. Análisis Probit de la biomasa activa de dos cepas nativas seleccionadas sometidas a distintos tratamientos.

Cepa / Tratamiento ¹	CL_{50} ² ($\mu\text{g/ml}$)	CV ³	Pendiente	$\chi^2(4\text{gl})$ ⁴
INTA H12-5				
S	1,3 [0,9-1,7]		1,7	1,5
S	1,6 [1,1-2,3]		1,5	3,2
Media ⁵	1,5 ^A	0,16		
ST	0,8 [0,5-1,1]		2,0	1,1
ST	0,8 [0,5-1,0]		2,1	1,3
Media	0,8 ^B	0,05		
INTA H42-1				
S	7,8 [4,6-36,3]		1,1	1,6
S	10,9 [6,5-45,1]		1,4	0,6
S	11,2 [6,8-40,6]		1,5	1,4
Media	10,0 ^A	0,19		

ST	3,7 [2,6-6,2]	1,4	3,8
ST	4,8 [3,8-6,7]	2,3	2,1
ST	3,2 [2,6-4,1]	2,4	2,5
Media	3,9^B	0,21	

¹S: *Pellet* seco, molido y solubilizado; ST: *Pellet* seco, molido, solubilizado y tripsinizado.

²Concentración letal media con límites de confianza de 95%. Los valores de las medias para una misma cepa con distinta letra presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba *t* de Student ($p < 0,05$). ³Coefficiente de variación. ⁴Chi-cuadrado con 4 grados de libertad. ⁵ Valor promedio de la CL₅₀ de distintos bioensayos.

3.3.3. Correlación entre los niveles de toxicidad de cepas exóticas de *Bacillus thuringiensis* y los obtenidos para cepas pertenecientes a los mismos serovares que se hallan como ingrediente activo de bioinsecticidas comerciales.

Considerando que uno de los bioinsecticidas recomendado para el control de *C. pomonella* tiene como ingrediente activo una cepa de *B. thuringiensis* svar. *aizawai* (Cichón *et al.* 2013), y que en este estudio se observó que existen otras cepas exóticas de *B. thuringiensis* más tóxicas que la cepa HD-137 perteneciente al svar. *aizawai* (Cuadro 3.13), se planteó la idea de cuantificar la virulencia de dos bioinsecticidas bacterianos a base de cepas pertenecientes a distintos serovares disponibles en nuestro mercado.

Se evaluó un producto comercial de 16.000 UI/ml y otro de 15.000 UI/ml formulados con cepas de *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* y svar. *aizawai* respectivamente. Se equipararon las potencias de los productos a las de valor menor, se realizaron bioensayos finos y se estimaron los valores de CL₅₀ (Cuadro 3.15).

Cuadro 3.15. Análisis Probit de suspensiones de dos bioinsecticidas comerciales equilibrados en potencia.

Ingrediente activo	CL ₅₀ (µg/ml) ¹	CV ²	Pendiente	χ ^{2 3}
<i>B. thuringiensis</i>	19,9 [12,1-32,6]		1,2	4,9
svr. <i>kurstaki</i>	24,9 [12,7-50,2]		0,8	2,1
	31,6 [17,3-60,9]		0,9	3,4
Media⁴	25,5^A	0,23		
<i>B. thuringiensis</i>	1585,4 [751,5-3783,8]		0,7	3,6
svr. <i>aizawai</i>	1843,9 [724,4-6185,4]		0,5	1,5
	1926,0 [810,9-5743,1]		0,6	2,1
Media	1785,1^B	0,10		

¹ Concentración letal media con límites de confianza de 95%. Los valores de las medias para una misma cepa con distinta letra presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba *t* de Student ($p < 0,05$). ² Coeficiente de variación. ³ Chi-cuadrado con 4 grados de libertad. ⁴ Valor promedio de la CL₅₀ de distintos bioensayos.

El bioinsecticida que contenía en su formulación una cepa del svar. *kurstaki* resultó significativamente más tóxico para *C. pomonella* que el del svar. *aizawai* ($t = 17,14$; $p < 0,0001$) (Cuadro 3.15). A pesar de que desconocemos la identidad y características de la cepa de *B. thuringiensis* *aizawai* utilizada en este último producto, los resultados experimentales se podrían correlacionar con los resultados de mortalidad obtenidos en ítems anteriores, en cuanto a la toxicidad mayor de la cepa HD-1 (svar.

kurstaki) respecto de HD-137 (svar. *aizawai*). De acuerdo a lo expuesto, estaría claro que la cepa HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* constituiría la mejor opción dentro de las cepas exóticas de *B. thuringiensis*.

3.4. Análisis exploratorio de las variables que influyen en la producción de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* INTA H42-1 en medio de cultivo líquido.

La alta virulencia de *B. thuringiensis* INTA H42-1 para larvas de *C. pomonella*, sumado a que no se encontraron diferencias significativas en cuánto a toxicidad con la cepa HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* utilizada como referencia y porque presenta un perfil génico de toxinas insecticidas atípico que la hace “única”, se seleccionó a esta cepa como candidata para la elaboración de un bioinsecticida. Por ende, se requiere de un medio de cultivo adecuado para su producción, en el que la misma produzca grandes cantidades de cristales proteicos que sean capaces de generar un nivel de toxicidad apropiado. En esta etapa, se seleccionó un medio de cultivo líquido para la producción de INTA H42-1, y se trabajó en el análisis preliminar de las variables que influyen en la producción de sus proteínas insecticidas en medio de cultivo líquido.

3.4.1. Selección de un medio de cultivo líquido.

Se evaluaron cinco medios de esporulación de *B. thuringiensis* distintos, tres de ellos reportados en la bibliografía, y se los comparó con dos caldos formulados en el laboratorio (Caldos BM y Caldo TFM) (ver ítem 9.2 - “Materiales y métodos”). Sólo en el Caldo BM y en el Caldo 3 se logró una esporulación superior al 99% tras la observación de una alícuota bajo microscopio de contraste de fases, luego de 72 h de cultivo. En el resto se observaron porcentajes de esporulación entre un 30 y 50% luego de 120 h de incubación. Esto sugiere que esos caldos no eran propicios para la esporulación de INTA H42-1 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.

Sakharova *et al.* (1988), reportaron que un exceso de glucosa en el medio de cultivo puede conducir a una reducción en el número de células obtenidas y en la velocidad de crecimiento durante la fase exponencial, afectando la formación de esporas; adicionalmente establecieron que a niveles mayores a 15 g/l de extracto de levadura la esporulación se ve inhibida. Por ende, los niveles bajos de esporulación observados para los caldos TFM, 1 y 2 podrían deberse a un exceso de nutrientes presente en los medios de cultivo.

Teniendo en cuenta los parámetros de medición y el análisis de los resultados que se presentan (Cuadro 3.16), se seleccionó al caldo BM para continuar los estudios. La cepa INTA H42-1 produjo 3 veces más proteínas totales y una mayor densidad óptica en caldo BM que en el caldo 3.

Cuadro 3.16. Mediciones de densidad óptica, pH y cuantificación de proteínas de INTA H42-1 en caldos de esporulación.

Medio	DO ¹	pH	Proteínas (µg/ml)
*Caldo BM	2,04	7,2	263,5
Caldo 3	1,79	7,7	80,6

¹ Densidad óptica. *Fue necesario realizar dilución al ½, ya que el cultivo original superaba la absorbancia máxima medible por el espectrofotómetro utilizado.

Se ha encontrado también que la limitación de nutrientes en el medio de fermentación tiene efectos negativos sobre el crecimiento celular y formación de bioproductos (Amin 1994). Por tal motivo, la menor producción de proteínas y densidad óptica obtenida en el Caldo 3 con respecto al BM, podría asociarse con las menores concentraciones de fuente de carbono:nitrógeno que presenta el Caldo 3 en su formulación (ver ítem 9.2 - “Materiales y métodos”).

3.4.2. Determinación de los componentes del medio que influyen significativamente en 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, afectaban significativamente la producción de proteínas de la biomasa activa de *B. thuringiensis* INTA H42-1. La determinación de estos componentes sería de utilidad, para lograr en estudios futuros, la optimización de un medio de cultivo propicio para su producción. En el cuadro 3.17 se presentaron los valores de proteínas totales obtenidos tras la cuantificación.

Cuadro 3.17. 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	136,67	168,813
2	215,31	178,17
3	31,81	68,95
4	194,68	199,05
5	168,5	167,88
6	12,15	-19,99
7	201,27	196,89
8	158,2	153,82
9	42,11	41,49
10	372,61	340,46
11	57,09	57,71
12	223,74	260,88

El análisis estadístico determinó que la glucosa ($E = 4,61$; $p = 0,019$) es el único componente que mostró un efecto positivo y significativo sobre la producción de proteínas en las concentraciones evaluadas. El resto de los componentes no mostraron un efecto significativo ($p \leq 0,05$): NaCl ($E = -2,57$; $p = 0,08$), $MnSO_4 \cdot H_2O$ ($E = -2,43$; $p = 0,09$), almidón soluble ($E = 2,1$; $p = 0,12$), extracto de levadura ($E = -1,8$; $p = 0,17$),

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($E = -1,35$; $p = 0,27$), KH_2PO_4 ($E = 1,14$; $p = 0,34$) y K_2HPO_4 ($E = -0,87$; $p = 0,44$). En la figura 3.20 se observa el gráfico de Pareto donde se encuentran representados cada uno de los componentes del medio con su efecto estandarizado ($E = \text{estadístico } t$) y en distintos colores si afectan positivamente o negativamente la producción de proteínas.

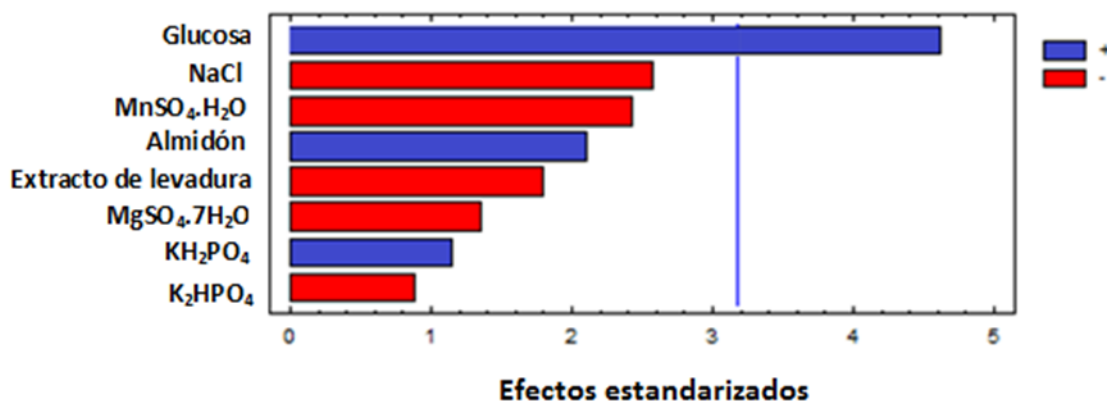


Fig. 3.20. Gráfico de Pareto con los efectos estandarizados de cada uno de los componentes del caldo BM. Nivel de significancia del 5%.

Como se mencionó anteriormente, el efecto de la glucosa sobre la producción de proteínas de INTA H42-1 fue significativo y positivo. Esto indicaría que mientras aumenta la proporción de glucosa en el medio, se genera una mayor cantidad de proteínas que se traduce en un aumento de la concentración de las mismas en la biomasa. La glucosa constituye la principal fuente de carbono del medio, proporcionando energía utilizable por las bacterias para realizar funciones vitales. Estas observaciones concuerdan con lo reportado por otros autores donde se describen los efectos significativos y positivos de la glucosa sobre la producción de proteínas insecticidas Cry en varias cepas de *B. thuringiensis* (Anderson y Jayaraman 2003; Ben Khedher *et al.* 2011; Devidas *et al.* 2014). Sin embargo, este tipo de efecto positivo sobre la síntesis de proteínas del cristal se daría hasta una concentración máxima de glucosa, por encima de la cuál, la concentración de proteínas insecticidas que se obtenga iría en disminución. Este valor de concentración de glucosa estaría entre 20 y 30 g/l, dependiendo del medio de cultivo y la cepa utilizada (Anderson y Jayaraman 2003; Ben Khedher *et al.* 2011). Esto se debería a que a concentraciones altas de glucosa, varios operones involucrados en la síntesis de proteínas Cry podrían verse reprimidos (Magasanik *et al.* 1987). Por lo expuesto, la concentración óptima de glucosa para la producción de INTA H42-1 en el caldo en estudio estaría por encima del máximo de 7,5 g/l ensayado durante este trabajo (ver ítem 9.3 - “Materiales y métodos”). En estudios posteriores se deberían ensayar caldos con concentraciones crecientes de glucosa, con el objeto de establecer aquella concentración que permita obtener la mayor cantidad de proteínas insecticidas de INTA H42-1. Por otra parte, Ghribi *et al.* (2007) reportaron que el efecto de represión catabólica por carbono puede ser superado a través de un control adecuado de la aereación, por lo se que deberían realizar también otros estudios de este estilo, para lograr la optimización de la producción de proteínas insecticidas.

Se ha descrito también que el aumento de las concentraciones de glucosa conduce a un incremento del tamaño de las inclusiones cristalinas con un mayor

contenido de proteínas y mayor actividad insecticida. Scherrer *et al.* (1973) ensayaron caldos con concentraciones de glucosa que variaron entre 0 y 15 g/l, obteniendo cristales entre 0,5 y 2,0 μm , concentraciones de proteínas entre 0,12 y 1,10 mg/5.10⁸ cristales, causando mortalidad creciente en larvas de *Pieris brassicae* L. (Lepidoptera: Pieridae) a medida que las concentraciones de glucosa iban en aumento. Además se vió que en ausencia de glucosa, la biomasa total y el recuento de esporas obtenidas son bajas, con valores de 3,7 g/l de peso seco y 1,8x10⁸ esporas/ml respectivamente (Saksinchai *et al.* 2001).

Además de la glucosa, el almidón soluble es otra fuente de carbono presente en el medio. La primera en metabolizarse sería la glucosa, ya que es una molécula simple y requiere menos energía para ese proceso. Ben Khedher *et al.* (2013) informaron previamente que los niveles de almidón fueron críticos para la producción de proteínas insecticidas, favoreciendo específicamente su biosíntesis. Sin embargo, tal como muestra la figura 3.20, el almidón soluble también mostró un efecto positivo sobre la producción de proteínas, por lo que este componente también influiría favorablemente en la síntesis de proteínas cristalinas insecticidas, pero en este caso, lo haría no significativamente.

Por otro lado, el extracto de levadura representa la fuente de nitrógeno en el medio, un componente esencial para la síntesis de proteínas. Avignone-Rossa *et al.* (1990) reportaron un incremento en las concentraciones de proteínas insecticidas obtenidas cuando ensayaron caldos con concentraciones de extracto de levadura entre 2 y 10 g/l. De igual modo, Ben Khedher *et al.* (2011) observaron este mismo tipo de efecto positivo, pero a su vez significativo, sobre la producción de proteínas insecticidas en caldos con extracto de levadura entre 4 y 6 g/l. En cambio, en el presente estudio, el extracto de levadura mostró un efecto negativo sobre la producción de proteínas constituyendo una rareza (Fig. 3.20). Quiere decir que a medida que aumentó la concentración de extracto de levadura en el medio, disminuyó aunque no significativamente la concentración de proteínas producidas.

Es sabido 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 insecticidas (Ertola, 1987), y considerando que el análisis de Plackett-Burman sólo detecta efectos principales sin tener en cuenta interacciones (Plackett y Burman, 1946), resultaría de interés para futuros estudios, avanzar en el análisis de la interacción entre la glucosa y el extracto de levadura.

Una vez finalizada la optimización del caldo, este se debería comparar con el medio basal, con la finalidad de verificar la contribución significativa en la producción de proteínas insecticidas. Se podrían establecer relaciones con el número de esporas obtenidas en cada medio, para tratar de estimar el tamaño de los cristales. Una mayor concentración de proteínas por cantidad de esporas en el medio mejorado podría estar relacionada con un aumento en el tamaño de los cristales (Pérez 2016). Por último, se deberían realizar bioensayos con larvas de *C. pomonella* para comparar la actividad insecticida de biomasas obtenidas a partir de los caldos mejorado y basal. Es de esperar que un aumento significativo en la producción de proteínas en el medio mejorado con respecto al basal, se tradujera en un aumento significativo en el nivel de actividad insecticida (Pérez 2016).

▪ Resumen de los resultados obtenidos en la sección 3.

- Se obtuvieron mortalidades para *C. pomonella* que variaron entre 2,6% y 95,8%. Los cinco aislamientos que resultaron ser los más tóxicos fueron *B. thuringiensis* INTA H12-5, INTA Mo1-7, INTA 54-8, INTA L93-3 e INTA H42-1 con mortalidades del 95,8%, 95,8%, 95,8%, 93,8% y 89,6% respectivamente.
- En esta etapa preliminar, ninguna de las cepas exóticas de *B. thuringiensis* resultó más tóxica que las cinco cepas nativas seleccionadas. La cepa HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* resultó la más tóxica entre las cepas exóticas.
- Los cinco aislamientos de *B. thuringiensis* más tóxicos para *C. pomonella* se asemejaron fenotípica y genotípicamente a la cepa HD-1 perteneciente al svar. *kurstaki* utilizada como referencia.
- Teniendo en cuenta los valores de CL_{50} obtenidos y sus límites fiduciales, las cepas nativas INTA H12-5 (1,2 $\mu\text{g/ml}$) e INTA L93-3 (1,4 $\mu\text{g/ml}$) resultaron ser las más tóxicas para *C. pomonella*, incluso más tóxicas que la cepa exótica *B. thuringiensis* svar. *kurstaki* HD-1 (1,7 $\mu\text{g/ml}$). No obstante, las diferencias entre ellos no fueron estadísticamente significativas.
- Los cristales de INTA H12-5 e INTA H42-1 fueron sometidos a distintos tratamientos y se observó que la toxicidad de los mismos aumentó significativamente con la tripsinización *in vitro*, lo que sugeriría que *C. pomonella* no posee las enzimas y/o los niveles adecuados de las mismas para el procesamiento completo de las proteínas Cry en el intestino medio.
- El bioinsecticida que contenía en su formulación una cepa del svar. *kurstaki* ($CL_{50}=25,5 \mu\text{g/ml}$) como ingrediente activo resultó significativamente más tóxico para *C. pomonella* que el que contenía a una del svar. *aizawai* ($CL_{50}=1785,1 \mu\text{g/ml}$).
- La cepa nativa INTA H42-1 se constituyó como la mejor opción para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nuevo destinado al control de la Carpocapsa, debido a que su toxicidad no presentó diferencias significativas con respecto a la de la cepa svar. *kurstaki* HD-1 y por poseer un perfil de genes *cry* característico.
- Se seleccionó al caldo BM para la producción de INTA H42-1 porque fue en el cual se obtuvo la mayor producción de proteínas totales.
- La glucosa es el único componente de medio que mostró un efecto positivo y significativo sobre la producción de proteínas en las concentraciones evaluadas.

Capítulo 4:

Conclusiones generales

Capítulo 4: Conclusiones generales

Los estudios realizados a lo largo de este trabajo han permitido consolidar una estrategia funcional en el laboratorio para la obtención de proteínas Cry individuales. Estas proteínas permitieron realizar por primera vez estudios de toxicidad utilizándolas bajo esa modalidad, en una población argentina de *C. pomonella*. Las diferencias observadas en la susceptibilidad de esta población nativa con respecto a otras europeas, nos mostraron la importancia de la evaluación de proteínas insecticidas individuales en distintas poblaciones de insectos, en lugar de la extrapolación de resultados de una región a otra con el objeto de seleccionar las proteínas más activas. Además, estas proteínas Cry permitieron revelar como interactúan entre sí, al administrarlas de forma combinada a *C. pomonella*. De este modo, se describieron los primeros reportes de interacción de tipo sinérgica en lepidópteros para la mezcla Cry1Ab y Cry1Ia y de tipo aditiva para la mezcla Cry1Aa y Cry1Ia.

Por otra parte, estos estudios nos mostraron también por primera vez, que el aislamiento de nuevos aislados de *B. thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de *Carpocapsa* era posible. Ciertos caracteres fenotípicos y genotípicos de algunos de ellos (INTA L277-5, INTA L277-10 e INTA L280-4), hicieron pensar que podrían presentar una actividad insecticida novedosa para larvas de insectos pertenecientes a otras especies de órdenes distintos a los estudiados.

Estos estudios develaron además, que el control de *C. pomonella* con *B. thuringiensis* en la región podría ser optimizado. Se evidenció que existen otras cepas de *B. thuringiensis* más tóxicas que las del serovar utilizado como ingrediente activo en uno de los bioinsecticidas recomendado para su control en la región. El empleo de bioinsecticidas comerciales con cepas del svar. *kurstaki* en lugar de formulados con cepas del svar. *aizawai* constituirían la mejor opción.

Finalmente, estos estudios permitieron la selección de la cepa nativa *B. thuringiensis* INTA H42-1 con un novedoso perfil de genes de toxinas insecticidas y con alta actividad para larvas de *C. pomonella*. Este recurso genético nativo se constituyó como candidata para la elaboración de un bioinsecticida para un control óptimo de dicha plaga en la región. Asimismo, estos estudios permitieron el análisis de los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de INTA H42-1, destacándose la importancia de la glucosa como factor significativo en la producción de las proteínas de los cristales. Por el contrario, el efecto negativo aunque no significativo del extracto de levadura sobre la producción de las mismas no resulta común.

Los resultados obtenidos durante este trabajo de tesis significan aportes sustanciales al desarrollo de tecnologías destinadas al control de esta plaga.

Se destacan a continuación las siguientes conclusiones:

Sección 1: Clonado y expresión de factores de virulencia activos de *Bacillus thuringiensis* y análisis de la toxicidad de proteínas Cry de *B. thuringiensis* para larvas de *Carpocapsa* (*Cydia pomonella* L.).

- Se consolidó en el laboratorio una estrategia para el clonado y expresión de genes *cry* en *B. thuringiensis*.

- Se obtuvieron clones recombinantes de *B. thuringiensis* que expresan proteínas Cry1 y Cry2 individualmente. Debido a que todos ellos produjeron concentraciones de proteínas mayores que pSVP27-4Q7, mostraron estructuras similares a cristales tras la esporulación, y sus proteínas causaron mortalidad en larvas de *C. pomonella* o alteraron significativamente su crecimiento. Aunque no en todos los casos se pudo identificar la banda correspondiente en SDS-PAGE.
- La mortalidad causada por los clones transformados con *cry2Aa* en larvas de *A. aegypti* refuerza la premisa de que se estarían expresando.
- No se logró comprobar fehacientemente la expresión de *cry2Ab*, debido a que sus clones no causaron mortalidad en *C. pomonella*.
- Las proteínas individuales Cry1Aa y Cry1Ab de *B. thuringiensis* poseen altos niveles de toxicidad para *C. pomonella*, por lo que podrían utilizarse para el control de este lepidóptero, ya sea formando parte de bioinsecticidas de primera generación o de organismos modificados genéticamente expresando dichas toxinas.
- El uso simultáneo de las toxinas Cry1Ab/Cry1Aa también podría emplearse en organismos genéticamente modificados para un control óptimo de *C. pomonella*, ya que dicha mezcla mostró un efecto sinérgico.
- El uso combinado de las toxinas Cry1Aa/Cry2Aa y Cry1Ab/Cry2Aa en organismos genéticamente modificados debería ser evitado, ya que mostraron un antagonismo moderado y probablemente compartan el mismo sitio de unión.

Sección 2: Aislamiento y caracterización de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis* a partir de larvas vivas y sanas de *Carpocapsa*.

- Fue factible aislar *B. thuringiensis* de larvas vivas y sanas de *C. pomonella* a partir de zonas de producción.
- Los aislamientos obtenidos resultaron diferentes a las cepas svar. *kurstaki* HD-1 y svar. *morrisoni tenebrionis* DSM2803 utilizadas como referencia, debido a que mostraron diferentes perfiles proteicos de sus cristales y a que no son portadores de genes codificantes de las mismas toxinas.
- Los distintos aislamientos obtenidos a partir de L276 por un lado, y de L277 por otro, serían aislamientos “gemelos” de *B. thuringiensis* debido a que comparten los mismos caracteres fenotípicos y genotípicos.
- Los aislamientos de *B. thuringiensis* obtenidos a partir de larvas vivas y sanas de *C. pomonella* se deberían a que fueron aislados como saprófitos, habiendo llegado posiblemente a las larvas por ingestión de alimento contaminado o por contacto con esporas libres de las bacterias.
- La bajísima o ausente mortalidad causada por los aislamientos en larvas de *C. pomonella* y *A. aegypti* se debería a que no producirían toxinas lepidopteridas ni dipteridas, ya que carecen de los genes de toxinas responsables de toxicidad en los insectos hospedantes más conocidos.
- La baja toxicidad de ciertos aislamientos para *A. diaperinus* se debería a toxinas Cry8, por ser portadores del correspondiente grupo de genes *cry*, a que se asociaron con la presencia de un cristal ovoide y a una proteína de ca. 130 kDa.

- Es probable que estos aislamientos sean portadores de genes de toxinas insecticidas no buscados durante este trabajo y/o con un espectro de acción distintos a los estudiados, o simplemente no tóxicas.
- Serían necesarios nuevos ensayos biológicos de patogenicidad utilizando nuevas especies de insectos hospedantes, para confirmar actividad tóxica de estos aislamientos nativos.
- Estos aislamientos nativos podrían emplearse en el desarrollo de bioinsecticidas en caso de detectarse alguna actividad tóxica de interés debido a que carecen de β -exotoxina.

Sección 3: Selección de una cepa con alta actividad hacia larvas de *Cydia pomonella* y análisis de los componentes de un medio de cultivo líquido que influyen en la producción de proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*.

- Se logró la selección preliminar de cinco cepas nativas (INTA H12-5, INTA Mo1-7, INTA 54-8, INTA L93-3, e INTA H42-1), que resultaron ser las más tóxicas para larvas de *C. pomonella*.
- Las características fenotípicas y genotípicas de las cepas seleccionadas se asemejaron a caracteres típicos de cepas de *B. thuringiensis* lepidopteridas. A su vez, mostraron perfiles electroforéticos de Rep-PCR idénticos a la cepa de referencia HD-1, lo que indicaría su pertenencia al serovar *kurstaki*.
- Considerando que HD-1 (svar. *kurstaki*) y todas las cepas nativas seleccionadas resultaron más tóxicas que la cepa HD-137 (svar. *aizawai*), sería factible el mejoramiento del control de *C. pomonella*.
- *B. thuringiensis* INTA H42-1 se constituyó como la mejor opción para ser utilizada como ingrediente activo de un formulado nativo nuevo de alta toxicidad para *C. pomonella*, debido a que presenta variaciones en su perfil de genes de toxinas insecticidas distinguiéndose del resto de las cepas seleccionadas.
- La solubilización y tripsinización *in vitro* de los cristales de *B. thuringiensis* INTA H12-5 e INTA H42-1, incrementaría significativamente su virulencia en *C. pomonella*, por lo que se deduce que *C. pomonella* no posee las enzimas y/o los niveles adecuados de las mismas para el procesamiento completo de las proteínas Cry en el intestino medio.
- El bioinsecticida que contenía en su formulación una cepa del svar. *kurstaki* resultó significativamente más tóxico para *C. pomonella* que el del svar. *aizawai*.
- El caldo BM resultó un medio propicio para la producción de *B. thuringiensis* INTA H42-1 debido a que fue en el que se logró una mayor producción de proteínas totales.
- La glucosa constituye un componente importante del caldo BM ya que influyó significativa y positivamente en la producción de proteínas de *B. thuringiensis* INTA H42-1.

Bibliografía

Bibliografía

- Agaisse, H., Lereclus, D. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein? J. Bacteriol. 177: 6027-6032.
- 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: 524-540.
- Alvarez, A., Pera, L., Loto, F., Virla, E., Baigori, M. 2009. Insecticidal crystal proteins from native *Bacillus thuringiensis*- numerical analysis and biological activity against *Spodoptera frugiperda*. Tucuman, Argentina. Biotechnol. Lett. 31:77-82.
- 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: 401-409.
- Amin, G. 1994. Continuous production of glutamic acid by vertical rotating immobilized cell reactor of the bacterium *Corynebacterium glutamicum*. Bioresour. Technol. 47: 113-119.
- Andermatt, M., Mani, E., Wildbolz, TH., Liithy, P. 1988. Susceptibility of *Cydia pomonella* to *Bacillus thuringiensis* under laboratory and field conditions. Entomol. Exp. Appl. 49: 291-295.
- 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: 225-231.
- Andrews, R., Faust, R., Wabiko, H., Raymond, K., Bulla, L. 1987. The biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Biotechnol. 6: 163-232.
- Aragón, J. Insectos perjudiciales para la soja. IDIA XXI. 2002. 3: 75-82.
- Arantes, O., Lereclus, D. 1991. Construction of cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Gene. 108: 115-119.
- Arcas, J., Yantorno, O., Ertola, R. 1987. Effect of high concentration of nutrients on *Bacillus thuringiensis* cultures. Biotechnol. Lett. 9: 105.
- Argenbio. 2017. <http://www.argenbio.org/index.php>
- 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.
- Asano, S., Yamashita, C., Iizuka, T., Takeuchi, K., Yamanaka, S., Cerf, D., Yamamoto, T. 2003. A strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae* containing a novel *cry8* gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). Biol. Control. 28: 191-196.
- 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.
- Ballester, V., Granero, F., Tabashnik, B., Malvar, T., Ferré, J. Integrative model for binding of *Bacillus thuringiensis* toxins in susceptible and resistant larvae of the diamondback moth (*Plutella xylostella*). Appl. Environ. Microbiol. 199965:1413-1419.

- Baranek, J., Kaznowski, A., Konecka, E., Naimov, S. 2015. Activity of vegetative insecticidal proteins Vip3Aa58 y Vip3Aa59 of *Bacillus thuringiensis* against lepidopteran pests. J. Invertebr. Pathol. 130: 72-81.
- Baranek, J., Konecka, E., Kaznowski, A. 2017. Interaction between toxin crystals and vegetative insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis* in lepidopteran larvae. BioControl. 62: 649-658.
- Barbosa, L., Farias, D., Silva, Ide M., Melo, F., Ribeiro, B., Aguiar, R. 2015. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* 147, a Brazilian strain with high insecticidal activity. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 110: 822-823.
- Basile, J. 2008. "Fingerprinting" de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* mediante análisis de secuencias repetitivas extragénicas palindrómicas específicas (Rep-PCR). Tesis de Licenciatura. Universidad CAECE.
- Baxter, S., Zhao, J., Shelton, A., Vogel, H., Heckel, D. 2008. Genetic mapping of Bt-toxin binding proteins in a Cry1A-toxin resistant strain of diamondback moth *Plutella xylostella* Insect. Biochem. Mol. Biol., 38: 125-135.
- 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: 619-634.
- Benintende G, López-Meza J, Cozzi J, Ibarra J. 1999. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. Lett. Appl. Microbiol. 29: 151-155.
- Ben Khedher, S., Kamoun, A., Jaoua, S., Zouari, N. 2011. Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by sporeless and sporulating strains using response surface methodology. N. Biotechnol. 28: 705-712.
- Ben Khedher, S., Jaoua, S., Zouari, N. 2013. Application of statistical experimental design for optimisation of bioinsecticides production by sporeless *Bacillus thuringiensis* strain on cheap medium. Braz. J. Microbiol. 44: 927-933.
- Bergamasco, V., Gonçalves J., Polanczyk, R., Desidério, J., Lemos, M. 2011. Expression of a new *Bacillus thuringiensis* cry1Ia gene in *Escherichia coli* with strong activity against cotton pests. Aust. J. Basic Appl. Sci. 5: 526-533.
- Bernhard, K., Utz, R. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides for experimental and commercial uses. Pp 255-68 En: Entwistle, P., Cory, J., Bailey, M., Higgs, S. (ed.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental pesticide: theory and practice.
- Berón. C., Salerno, G. 2006. Characterization of *Bacillus thuringiensis* isolates from Argentina that are potentially useful in insect pest control. BioControl. 51: 779-794.
- Bloem, S., Bloem, K. 1998. Assessing the quality of mass-reared codling moths (Lepidoptera: Tortricidae) by using field release-recapture tests. J. Econ. Entomol. 91: 1122-1130.
- Boonserm, P., Davis, P., Ellar, D., Li, J. 2005. Crystal structure of the mosquito-larvicidal toxin Cry4Ba and its biological implications. J. Mol. Biol. 34: 363-382.

- Boomserm, P., Mo, M., Angsuthanassombat, C., Lescar, J. 2006. Structure of the functional form of the mosquito larvicidal Cry4Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* at a 2.8-Angstrom resolution. *J. Bacteriol.* 188: 3391-3401.
- Boncheva, R., Dukiandjiev, S., Minkov, I., de Maagd, R., Naimov, S. 2006. Activity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against codling moth (*Cydia pomonella* L.) larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 92: 96-99.
- Bosch, D., Rodríguez, M., Ávila, J. 2008. Biología y control de carpocapsa mediante el uso de estrategias combinadas. *Rev. Vida Rural.* 36-39.
- 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: 248-254.
- 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: 4965-4972.
- 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., Goodman, R., Raffa, K., Handelsman J. 2000. Synergy between zwittermicin A and *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae). *Environ. Entomol.* 29: 101-107.
- Broderick, N., Raffa, K., Handelsman, J. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103: 15196-15199.
- 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.
- Brown, R. 1979. The valid generic and tribal names for the codling moth, *Cydia pomonella* (Olethreutinae: Tortricidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* 72: 565-567.
- Brown, K., Whiteley, H. Molecular characterization of two novel crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni*. 1992. *J. Bacteriol.* 174: 549-557.
- 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.
- 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: 274-278.
- Butko, P. 2003. Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: data and hypotheses. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 2415-2422.
- Cannon, R. 1996. *Bacillus thuringiensis* use in agriculture: a molecular perspective. *Biol. Rev.* 71: 561-636.
- Carroll, J., Li, J., Ellar, D. 1989. Proteolytic processing of a coleopteran-specific delta-endotoxin produced by *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*. *Biochem. J.* 261: 99-105.

- Carozzi, N., Kramer, V., Warren, G., Evola, S., Koziel, M. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.
- Cavados, C., Fonseca, R., Chaves, J., Rabinovitch, L., Araújo-Coutinho, C. 2001. Identification of entomopathogenic *Bacillus* isolated from *Simulium* (Diptera, Simuliidae) larvae and adults. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 96: 1017-1021.
- Cerón, J., Covarrubias, L., Quintero, R., Ortiz, A., Ortiz, M., Aranda, E., Lina, L., Bravo, A. 1994. PCR Analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 353-356.
- Cherif, A., Ettoumi, B., Raddadi, N., Daffonchio, D., Boudabous, A. 2007. Genomic diversity and relationship of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus* by multi-Rep-PCR fingerprinting. *Can. J. Microbiol.* 53: 343-350.
- Choi, S., Shin, B., Kong, E.; Rho, H., Park, S. 2000. Cloning of a new *Bacillus thuringiensis* *cryII*-type crystal protein gene. *Curr. Microbiol.* 41: 65-69.
- Cichón, D., Fernández, E., Raffo, D. Manzanos y perales del valle. 2001. IDIA XXI. 1: 96-99.
- Cichón, L., Fernández, E. 2003. Curso de capacitación: Biología y control de *Carpocapsa Cydia pomonella* (L.). INTA Alto Valle, Río Negro. 82 pp.
- Cichón, L., Rossini, M., Garrido, S. 2013. Guía para el diseño de programas fitosanitarios en manzanos. Editorial INTA. https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_fitosanitario_manzana_web.pdf
- Chilcott, C., Ellar, D. 1988 Comparative toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal proteins *in vivo* and *in vitro*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 2551-2558.
- 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: 807-813.
- Crickmore, N., Baum, J., Bravo, A., Lereclus, D., Narva, K., Sampson, K., Schnepf, E., Sun, M., Zeigler, D. 2018. “*Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature”. <http://www.btnomenclature.info/>
- Dankocsik, C., Donovan, W., Jany, C. 1990. Activation of a cryptic crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* by gene fusion and determination of the crystal protein insecticidal specificity. *Mol. Microbiol.* 4: 2087-2094.
- de Barjac, H., Franchon, E. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. *Entomophaga.* 35: 233-240.
- de Maagd, R., Bravo, A., Crickmore, N. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends. Genet.* 17: 193-199.
- 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: 409-433.
- del Puerto Rodríguez, A., Suárez Tamayo, S., Palacio Estrada, D. 2014. Efectos de los plaguicidas sobre el ambiente y la salud. *Rev. Cubana Hig. Epidemiol.* 52: 372-387.

- 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., Berry, C. 2016. The pesticidal Cry6Aa toxin from *Bacillus thuringiensis* is structurally similar to HlyE-family alpha pore-forming toxins. *BMC Biol.* 30: 14:71.
- Deng, C., Peng, Q., Song, F., Lereclus, D. 2014. Regulation of cry gene expression in *Bacillus thuringiensis*. *Toxins.* 6:2194-2209.
- Deshayes, C., Siegwart, M., Pauron, D., Froger, J., Lapied, B., Apaire-Marchais, V. 2017. Microbial pest control agents: Are they a specific and safe tool for insect pest management? *Curr. Med. Chem.* 24: 2959-2973.
- Devidas, P., Pandit, B., Vitthalrao, P. 2014. Evaluation of different culture media for improvement in bioinsecticides production by indigenous *Bacillus thuringiensis* and their application against larvae of *Aedes aegypti*. *Sci. World J.* 273030.
- 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: 713-719.
- Dow, J. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect. Physiol.* 19: 187-328.
- Ertola, R. 1987. Production of *Bacillus thuringiensis* insecticides. Pp. 187-199 En: Aiba, S. (ed.). *Horizons of biochemical engineering.*
- Espinasse, S., Gohar, M., Chaufaux, J., Buisson, C., Perchat, S., Sanchis, V. 2002. Correspondence of high levels of beta-exotoxin I and the presence of cry1B in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 4182-4186.
- 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: 5389-5394.
- Feitelson, J., Payne, J., Kim, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Bio/Technology.* 10: 271-275.
- Ferré, J., Real, M., Van Rie, J., Jansens, S., Peferoen M. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 5119-5123.
- Finney, D. 1971. *Probit Analysis*, 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 333 pp.
- Fu, Z., Xiao, R., Luo, R., Hu, Z., Yang, H., Guo, Z., Lei, P., Shan, S. 2017. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* HD133. *Genome Announc.* 5:e00909-17.
- 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: 1101-1109.
- Gao, Y., Hu, Y., Fu, Q., Zhang, J., Oppert, B., Lai, F., Peng, Y., Zhang, Z. 2010. Screen of *Bacillus thuringiensis* toxins for transgenic rice to control *Sesamia inferens* and *Chilo suppressalis*. *J. Invertebr. Pathol.* 105: 11-15.

- Gaviria Rivera, A., Priest, F. 2003. Molecular typing of *Bacillus thuringiensis* serovars by RAPD-PCR. Syst. Appl. Microbiol. 26: 254-261.
- Giganti, H., Dapoto, G., Vermeulen, J. 2007. Manejo integrado de plagas de los frutales de pepita. Pp. 531- 580 En: Sozzi, G. O. (ed), Árboles frutales: ecofisiología, cultivo y aprovechamiento, Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires.
- Glare, T., O'Callaghan, M. 2000. Appendix 2.1 Invertebrate species reported as susceptible to Bt. Pp. 211-267 En: Glare, T., O'Callaghan, M. (Ed.). *Bacillus thuringiensis*: biology, ecology and safety.
- Goldberg, L., Margalit, J. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sergentie*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipens*. Mosq. News. 37: 355-358.
- González, J., Dulmage, H., Carlton, B. 1981. Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in *Bacillus thuringiensis*. Plasmid. 5: 352-365.
- Ghribi, D., Zouari, N., Trabelsi, H., Jaoua, S. 2007. Improvement of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin production by overcome of carbon catabolite repression through adequate control of aeration. Enz. Microbiol. Technol. 40: 614-622.
- Grossi-De-Sa, M., Quezado De Magalhães, M., Silva, M., Silva, S., Dias, S., Nakasu, E., Brunetta, P., Oliveira, G., Neto, O., Sampaio De Oliveira, R., Soares, L., Ayub, M., Siqueira, H., Figueira, E. 2007. Susceptibility of *Anthonomus grandis* (cotton boll weevil) and *Spodoptera frugiperda* (fall armyworm) to a *cryIIa*-type toxin from a Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain. J. Biochem. Mol. Biol. 40: 773-782.
- 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: 259-266.
- 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 Protein 2 (VIP2). Nat. Struct. Biol. 6: 932-936.
- Handelsman, J., Raffel, S., Mester, E., Wunderlich, L. Grau, C. 1990. Biological control of damping-off of alfalfa seedlings with *Bacillus cereus* UW85. Appl. Environ. Microbiol. 56: 713-718.
- Hao, Z., Yan, L., Liu, J., Song, F., Zhang, J., Li, X. 2015. Extraction of antibiotic zwittermicin A from *Bacillus thuringiensis* by macroporous resin and silica gel column chromatography. Biotechnol. Appl. Biochem. 62: 369-374.
- Hilbeck, A., Moar, W., Pusztai-Carey, A., Filippini, A., Bigler, F. 1998. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin to the predator *Chrysoperla carnea*. Neuroptera: Chrysopidae. Environ. Entomol. 27: 480-487.

Hoffmaster, A., Ravel, J., Rasko, D., Chapman, G., Chute, M., Marston, C., De, B., Sacchi, C., Fitzgerald, C., Mayer, L., Maiden, M., Priest, F., Barker, M., Jiang, L., Cer, R., Rilstone, J., Peterson, S., Weyant, R., Galloway, D., Read, T., Popovic, T., Fraser, C. 2004. Identification of anthrax toxin genes in a *Bacillus cereus* associated with an illness resembling inhalation anthrax. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 101: 8449-8454.

Hongyu, Z., Ziniu, Y., Wangxi, D. 2000. Composition and ecological distribution of cry proteins and their genotypes of *Bacillus thuringiensis* isolates from warehouses in China. *J. Invertebr. Pathol.* 76: 191-187.

Huber, H., Lüthy, P. 1981. *Bacillus thuringiensis* δ -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: 5269-5274.

Insell, J., Fitz-James, P. 1985. Comparison and toxicity of the inclusion of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 56-62.

Iriarte, J., Caballero, P. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. Pp. 15-44 En: Caballero, P., Ferré, J. (ed.). *Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el control integrado de plagas*.

Jain, D., Udayasuriyan, V., Arulselvi, P., Dev, S., Sangeetha, P. 2006. Cloning, characterization, and expression of a new *cry2Ab* gene from *Bacillus thuringiensis* strain 14-1. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 128: 185-94.

James, C. 2010. Global status of commercialized biotech/GM crops. ISAAA Briefs 42: (ISAAA, Ithaca, NY, 2011).

Jaquet, F., Hutter, R., Luthy, P. 1987. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 500-504.

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: 117-124.

Jeong, H., Park, S., Choi, S. 2014. Genome sequence of the acrySTALLIFEROUS *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* strain 4Q7, widely used as a recombination host. *Genome Announc.* 3; 2(2).

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: 383-391.

Johnson, D., Oppert, B., McGaughey, W. 1998. Spore coat protein synergizes *Bacillus thuringiensis* crystal toxicity for the Indianmeal moth (*Plodia interpunctella*). *Curr. Microbiol.* 36: 278-282.

Johnston, P., Crickmore, N. 2009. Gut bacteria are not required for the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* toward the tobacco hornworm, *Manduca sexta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75(15): 5094-5099.

- Juárez-Pérez, V., Ferrandis, M., Frutos, R. 1997. PCR-based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002.
- 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: 867-871.
- 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: 1027-1032.
- 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*. P. 14 En: Khetan (ed.). *Microbial Pest*.
- Klier, A., Fargette, F., Ribier, J., Rapoport, G. 1982. Cloning and expression of the crystal protein genes from *Bacillus thuringiensis* strain Berliner 1715. *EMBO J.* 1: 791-799.
- Konecka, E., Kaznowski, A., Ziemnicka, J., Ziemnicki, K., Paetz, H. 2007. Analysis of cry gene profiles in *Bacillus thuringiensis* strains isolated during epizootics in *Cydia pomonella* L. *Curr. Microbiol.* 55: 217-222.
- Konecka, E., Hrycak, A., Kaznowski, Adam. 2015. Synergistic effect of *Bacillus thuringiensis* crystalline toxins against *Cydia pomonella* (Linnaeus) (Tortricidae: Lepidoptera). *Entomol. Generalis.* 35: 157–166.
- Kostichka, K., Warren, G., Mullins, M., Mullins, A., Craig, J., Koziel, M., Estruch, J. 1996. Cloning of cryV-type insecticidal protein gene from *Bacillus thuringiensis*: the cryV encoded protein is expressed early in stationary phase. *J. Bacteriol.* 178: 2141-2144.
- Lacey, L., Unruh, A. 2007. Biological control of codling moth (*Cydia pomonella*, Lepidoptera: Tortricidae) and its role in integrated pest management, with emphasis on entomopathogens. *Vedalia.* 12: 33-60.
- Lee, MK., Curtiss, A., Alcantara, E., Dean, DH. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins CryIAa and CryIAC on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 583-586.
- Lemes, A.; Davolos, C., Legori, P., Fernandes, O., Ferré, J., Lemos, M., Desiderio, J. 2014. Synergism and antagonism between *Bacillus thuringiensis* Vip3A and Cry1 proteins in *Heliothis virescens*, *Diatraea saccharalis* and *Spodoptera frugiperda*. *PLoS One* 9: e107196.
- Lereclus, D., Agaisse, H., Gominet, M., Chaufaux, J. 1995. Overproduction of encapsulated insecticidal crystal proteins in a *Bacillus thuringiensis* spo0A mutant. *Biotechnology.* 13: 67-71.
- Letourneau, D., Hagen, J., Robinson, G. 2002. Bt-crops: evaluating benefits under cultivation and risks from escaped transgenes in the wild. Pp. 33-98 En: Letourneau, D., Burrows, B (Ed.). *Genetically engineered organisms: assessing environmental and human health impacts*.
- Li, H., Bouwer, G. 2012. The larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Thaumotobia leucotreta* (Lepidoptera: Tortricidae). *Crop Protection.* 32: 47-53.

- Li, H., Bouwer, G. 2014. Evaluation of the synergistic activities of *Bacillus thuringiensis* Cry proteins against *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebr. Pathol.* 121: 7-13.
- Li, J., Carroll, J., Ellar, D. 1991. Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2,5 Å resolution. *Nature*. 353: 815-821.
- 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: 3075-3080.
- Lin, J., Chen, Q., Tian, H., Gao, X., Yu, M., Xu, G., Zhao, F. 2008. Stain efficiency and MALDI-TOF MS compatibility of seven visible staining procedures. *Anal. Bioanal. Chem.* 390: 1765-1773.
- 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: 1385-1389.
- Liu, X., Lei, C., Sun, X. 2013. Control efficacy of *Bacillus thuringiensis* and a new granulovirus isolate against *Cydia pomonella* in orchards. *Biocontrol Sci. Technol.* 23: 691-700.
- Liu, G., Deng, C., Song, L., Peng, Q., Zhang, J., Lereclus, D., Song, F. 2014a. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain LM1212, isolated from the cadaver of an *Oryctes gigas* larva in Madagascar. *Genome Announc.* 29; 2(3).
- Liu, B., Liu, G., Hu, G., Cetin, S., Lin, N., Tang, J., Tnag, W., Lin, Y. Z. 2014b. *Bacillus bingmayongensis* sp. nov., isolated from the pit soil of Emperor Qin's Terra-cotta warriors in China. *Antonie van Leeuwenhoek.* 105: 501-510.
- Liu, Y., Du, J., Lai, Q., Zeng, R., Ye, D., Xu, J., Shao, Z. 2017. Proposal of nine novel species of the *Bacillus cereus* group. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 2499-2508.
- Loewy, M., Kira, V., Carvajal, G., Venturino, A., D'Angelo, A. 1999. Groundwater contamination by azinphos methyl in the Northern Patagonia region (Argentina). *Sc. Tot. Environ.* 225: 211-218.
- López-Meza, J., Ibarra, J. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1306-1310.
- Lopez, M., Flores, J., Mendoza, P., Vazquez, V., Leibano, E., Bravo, A., Herrera, D., Godines, E., Vargas, P., Zamudio, F. 2006. Use of *Bacillus thuringiensis* toxin as an alternative method of control against *Haemonchus contortus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081: 347-354.
- Loeza-Lara, P., Benintende, G., Cozzi, J., Ochoa-Zarzosa, A., Baizabal-Aguirre, V., Valdez-Alarcón, J; López-Meza, J. 2005. The plasmid pBMBt1 from *Bacillus thuringiensis* subsp. *darmstadiensis* (INTA Mo14-4) replicates by the rolling-circle mechanism and encodes a novel insecticidal crystal protein-like gene. *Plasmid.* 54: 229-240.
- López-Pazos, S., Cerón, J. 2010. Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* y su interacción con coleópteros. *NOVA.* 8: 183-194.
- 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: 567-577.

- 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: 2437-2442.
- 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. 1318-1325.
- Mahadeva Swamy, H., Asokan, R., Mahmood, R., Nagesha, S. 2013. Molecular characterization and genetic diversity of insecticidal crystal protein genes in native *Bacillus thuringiensis* isolates. Curr. Microbiol. 66: 323-330.
- Mahdavi, A., Ghadamyari, M., Sajedi, R., Sharifi, M., Kouchaki, B. 2013. Identification and partial characterization of midgut proteases in the lesser mulberry pyralid, *Glyphodes pyloalis*. J. Insect. Sci. 13: 81.
- Mahillon, J., Rezsőhazy, R., Hallet, B., Delcour, J. 1994. IS231 and other *Bacillus thuringiensis* transposable elements: a review. Genetica. 93: 13-26.
- Mahillon, J., Lereclus, D. 2000. Electroporation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus cereus*. Electrotransformation of Bacteria. 242-252 pp.
- Martínez, C., Ibarra, J., Caballero, P. 2005. Association analysis between serotype, cry gene content, and toxicity to *Helicoverpa armigera* larvae among *Bacillus thuringiensis* isolates native to Spain. J. Invertebr. Pathol. 90: 91-97.
- Marcon, J., Taketani, R., Dini-Andreote, F., Mazzero, G., Soares, F. Junior; Melo, I., Azevedo, J., Andreote, F. 2014. Draft genome sequence of *Bacillus thuringiensis* strain BrMgv02-JM63, a chitinolytic bacterium isolated from oil-contaminated mangrove soil in Brazil. Genome. Announc. 30: 2(1).
- Martins, E., Aguiar, R., Martins, N., Melatti, V., Falcao, 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. Microbiol. 104: 1363-1371.
- Masson, L., Erlandson, M., Puzstai-Carey, M., Brousseau, R., Juárez-Pérez, V., Frutos, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4782-4788.
- McLaughlin, R., Dulmage, H., Alls, R., Couch, T., Dame, E., Hall, R., Rose, R., Versoi, P. 1984. U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. Bull. Entomol. Soc. Am. 30: 26-29
- McNeil, B., Dean, D. 2011. *Bacillus thuringiensis* Cry2Ab is active on *Anopheles* mosquitoes: single D block exchanges reveal critical residues involved in activity. FEMS Microbiol. Lett. 325:16-21.
- MECON. 2014. https://www.economia.gob.ar/peconomica/docs/Complejo_pepitas.pdf
- Méndez-López, 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: 73-77.

Merril, C., Switzer, R., Van Keuren, M. 1979. Trace polypeptides in cellular extracts and human body fluids detected by two-dimensional electrophoresis and a highly sensitive silver stain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76: 4335-4339.

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.* 66: 4744-4753.

MinAgri. Sistema integrado de información agropecuaria. 2018. <http://www.siaa.gov.ar>

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: 7029-7035.

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: 241-248.

Navas, L., Amadio, A., Ortiz, E., Sauka, D., Benintende, G., Berretta, M., Zandomeni, R. 2016. Complete sequence and organization of pfr260, the *Bacillus thuringiensis* Inta Fr7-4 plasmid harboring insecticidal genes. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 27: 43-54.

Ohba, M., Aratake, Y. 1994. Comparative study of the frequency and flagellar serotype flora of *Bacillus thuringiensis* in soils and silkworm-breeding environments. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 203-209.

Onco, M. 2012. Distribución de genes *vip1* y *vip2* codificantes de proteínas tóxicas para coleópteros en *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Licenciatura. Universidad CAECE.

Oppert, B., Kramer, K., Johnson, D., McGaughey, W. 1994. Altered protoxin activation by midgut enzymes from a *Bacillus thuringiensis* resistant strain of *Plodia interpunctella*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 198: 940-947.

Oppert, B., Kramer, K., Beeman, R., Johnson, D., McGaughey, W. 1997. Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Biol. Chem.* 272: 23473-23476.

Palma, L., Muñoz, D., Berry, C; Murillo, J., Caballero, P. 2014. *Bacillus thuringiensis* Toxins: An overview of their biocidal activity. *Toxins.* 6: 3296-3325.

Paramasiva, I., Shouche, Y., Kulkarni, G., Krishnayya, P., Akbar, S., Sharma, H. 2014. Diversity in gut microflora of *Helicoverpa armigera* populations from different regions in relation to biological activity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin Cry1Ac. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 87: 201-213.

Parra Morales, LB., Alzogaray, R., Cichón, L., Garrido, S., Soleño, J., Montagna, C. 2017. Effects of chlorpyrifos on enzymatic systems of *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae) adults. *Insect Sci.* 24: 455-466.

Pardo-López, L., Soberón, M., Bravo, A. 2012. *Bacillus thuringiensis* insecticidal three-domain Cry toxins: mode of action, insect resistance and consequences for crop protection. *FEMS Microbiol. Rev.* 37: 3-22.

- Park ,H., Ge, B., Bauer, L., Federici, B. 1998. Optimization of Cry3A yields in *Bacillus thuringiensis* by use of sporulation-dependent promoters in combination with the STAB-SD mRNA sequence. *Appl Environ Microbiol.* 64: 3932-3938.
- Payne, J., Kennedy, M., Randall, J., Meier, H. 1993. Us Patent No 5,262,159.
- Pedarros, A., Berretta, M., Onco, M., Pérez, M., Sauka, D., Benintende, G. 2015. Susceptibilidad de distintas especies de insectos plaga a la proteína Cry1Ia de *Bacillus thuringiensis* INTA H4-3. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.
- Pérez, M. 2016. Factores de virulencia de *Bacillus thuringiensis* y su utilización para el control de coleópteros de alto impacto en el Sector Agropecuario. Tesis doctoral. UBA.
- Peyronnet, O., Vachon,V., Brosseau, R., Baines, D., Schwatz, J., Laprade, R. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on the membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 1679-1684.
- Pigott, C., Ellar, D. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. 2007. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 255-281.
- Plackett, R., Burman, J. 1946. The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika.* 33: 305-325.
- Poncet, S., Delécluse, A., Klier, A., Rapoport, G. 1995. Evaluation of synergistic interactions among the CryIVA, CryIVB, and CryIVD toxic components of *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *J. Invertebr. Pathol.* 66: 131-135.
- Poornima, K., Selvanayagam, P., Shenbagarathai, R. 2010. Identification of native *Bacillus thuringiensis* strain from South India having specific cytotoxic activity against cancer cells. *J. Appl. Microbiol.* 109: 348-354.
- 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.
- Quintana, G., Cóllica J. 2011. Carpocapsa, plaga clave en nogal. Informe técnico nº1. Ed. INTA.
- Rang, C., Lacey, L., Frutos, R. 2000. The crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *thompsoni* display a synergistic activity against the codling moth, *Cydia pomonella*. *Curr. Microbiol.* 40: 200-204.
- Rasko, D., Altherr, M., Han, C., Ravel, J. 2005. Genomics of the *Bacillus cereus* group of organisms. *FEMS Microbiol. Rev.* 29: 303-329.
- Raymond, B., Johnston, P., Wright, D., Ellis, R., Crickmore, N., Bonsall, M. 2009. A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environ. Microbiol.* 11: 2556-2563.
- Reyes-Ramirez, 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: 1346-1355.

- Reyes-Ramirez, A., Ibarra, J. 2008. Plasmid patterns of *Bacillus thuringiensis* type strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 125-129.
- Ricetto, A., Gomis-Cebolla, J., Vilas-Bôas, G., Ferré, J. 2016. Susceptibility of *Grapholita molesta* (Busck, 1916) to formulations of *Bacillus thuringiensis*, individual toxins and their mixtures. *J. Invertebr. Pathol.* 141:1-5.
- Rydel, 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.
- Rosell, G., Quero, C., Coll, J., Guerrero A. 2008. Biorational insecticides in pest management. *J. Pestic. Sci.* 33: 103-121.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Porcar, M., Martínez, C., Oguiza, J., Escriche, B., Ferré, J., Caballero, P. 2006. Molecular and insecticidal characterization of a Cry1I protein toxic to insects of the families Noctuidae, Tortricidae, Plutellidae, and Chrysomelidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 4796-4804.
- Ruiz de Escudero, I., Estela, A., Escriche, B., Caballero, P. 2007. Potential of the *Bacillus thuringiensis* toxin reservoir for the control of *Lobesia botrana* (Lepidoptera: Tortricidae), a major pest of grape plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 337-340.
- Saini, E. 2008. Insectos y ácaros perjudiciales al cultivo de soja y sus enemigos naturales. 80 pp.
- Saksinchai, S., Supphantharika, M., Verduyn, C. 2001 Application of a simple yeast extract from spent brewer's yeast for growth and sporulation of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*: a physiological study. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 307-316.
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor, New York.
- Sanchis, V., Lereclus, D., Menou, G., Chaufaux, J., Lecadet, M. 1988. Multiplicity of delta-endotoxin genes with different insecticidal specificities in *Bacillus thuringiensis aizawai* 7.29. *Mol. Microbiol.* 2: 393-404.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 74: 5463-5467.
- Sauka, D., Benintende, G. 2006. Caracterización de un aislamiento de *Bacillus thuringiensis* con rasgos atípicos. XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología. Pucón. Chile.
- 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., Sánchez, J., Bravo, A., Benintende, G. 2007. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins against bean shoot borer (*Epinotia aporema* Wals.) larvae, a major soybean pest in Argentina. *J. Invertebr. Pathol.* 94: 125-129.
- Sauka, D. Benintende, G. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. *Rev. Argent. 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., Basile, J., Benintende, G. 2011. Evidence of *Bacillus thuringiensis* intra-serovar 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: 373-380.
- 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*. Pp. 89-107 García de Salamone, I., Cassan, F. (Ed.). Asociación Argentina de Microbiología.
- Sauka, D., Pérez, M., López, N., Onco, M., Berretta, M., Benintende, G. 2014. PCR-based prediction of type I β -exotoxin production in *Bacillus thuringiensis* strains. *J. Invertebr. Pathol.* 122: 28-31.
- Sauka, D., Lopez, N., Berretta, M., Benintende, G. 2015. “Predicción de la producción de zwittermicina A en *Bacillus thuringiensis* a través de amplificación génica de *zmaA* y *zmaC*”. III Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental. Buenos Aires.
- Sauka, D., Benintende, G. 2017. Diversity and distribution of lepidopteran-specific toxin genes in *Bacillus thuringiensis* strains from Argentina. *Rev. Argent. Microbiol.* 49: 273-281.
- Scherrer, P., Luthy, P., Trumpi, B. 1973. Production of δ -endotoxin by *Bacillus thuringiensis* as a function of glucose concentrations. *J. Appl. Microbiol.* 644-646.
- Schnepf, E., Crickmore, N., Van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler D., Dean, D. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 68: 775-806.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2017.
- Sakharova, Z., Robotnova, I., Khovrychev, M. 1988. Growth and spore-forming in *Bacillus thuringiensis* at high substrate concentrations. *Mikrobiologiya.* 57: 992-995.
- Shao, Z., Liu, Z., Yu, Z. 2001. Effects of the 20-kilodalton helper protein on Cry1Ac production and spore formation in *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 5362-5369.
- Sharma, P., Nain, V., Lakhanpaul, S., Kumar, PA. 2010. Synergistic activity between *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab and Cry1Ac toxins against maize stem borer (*Chilo partellus* Swinhoe). *Lett. Appl. Microbiol.* 51: 42-47.
- 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: 389-392.
- Shu, C., Su, H., Zhang, J., He, K., Huang, D., Song, F. 2013. Characterization of *cry9Da4*, *cry9Eb2*, and *cry9Ee1* genes from *Bacillus thuringiensis* strain T03B001. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 9705-9713.
- Shu, C., Zhang, F., Chen, G., Joseph, L., Barqawi, A., Evans, J., Song, F., Li, G., Zhang, J., Crickmore, N. 2017. A natural hybrid of a *Bacillus thuringiensis* Cry2A toxin implicates Domain I in specificity determination. *J. Invertebr. Pathol.* 150: 35-40.

- Soberón, M., López-Díaz, J. A., & Bravo, A. 2013. Cyt toxins produced by *Bacillus thuringiensis*: A protein fold conserved in several pathogenic microorganisms. *Peptides*. 41: 87-93.
- Tabashnik, B. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3343-3346.
- Tabashnik, B., Liu, Y., Malvar, T., Heckel, D., Masson, L., Ballester, V., Granero, F., Ménsua, J., Ferré, J. 1997. Global variation in the genetic and biochemical basis of diamondback moth resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 12780-12785.
- Tabashnik, B., Brévault, T., Carrière, Y. 2013. Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. *Nat. Biotechnol.* 32: 510-521.
- Teixeira Correa, R., Mendes Pereira Adisson-Araujo, D., Gomes Monnerat R., Morais Ribeiro, B. 2012. Cytotoxicity analysis of three *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* δ -endotoxins towards insect and mammalian cells. *PLoS ONE* 7(9): e46121.
- 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: 771-775.
- Upadhyay, S., Singh, P. 2011. Role of alkaline phosphatase in insecticidal action of Cry1Ac against *Helicoverpa armigera* larvae. *Biotechnol. Lett.* 33: 2027-2036.
- 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: 119-127.
- Vaeck, M., Reynaerts, A., Hofte, H., Jansens, S., De Beuckeleer, M., Dean, C., Zabeau, M., Van Montagu, M., Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature*. 327: 33-37.
- van Frankenhuyzen, K., Gringorten, L., Gauthier, D. 1997. Cry9Ca1 toxin, a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with high activity against the spruce budworm (*Choristoneura fumiferana*). *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4132-4134.
- 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: 124-131.
- Vazquez-Padron, R., de la Riva, G., Agüero, G., Silva, Y., Pham, S., Soberón, M., Bravo, A., Aïtouche, A. 2004. Cryptic endotoxic nature of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab insecticidal crystal protein. *FEBS Lett.* 570: 30-36.
- Villarreal, P., Tappatá, A., Magnarelli, G., Tamburo, L., Cartes, C., Villegas, M. 2003. Evaluación técnico económica. Impacto de la carpocapsa (*Cydia pomonella* L.) en la producción de fruta de pepita de la Norpatagonia Argentina. pp. 50. Ed. FUNBAPA.
- Visser, B., Workum, M., Dulleman, A., Waalwijk, C. 1986. The mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* is associated with the M, 230000 and 130000 proteins. *FEMS Microbiol. Lett.* 30: 211-214.
- Walters, F., English, L. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. *Entomol. Exp. Appl.* 77: 211-216.

- Wang, J., Boets, A., Van Rie, J., Ren, G. 2003. Characterization of *cry1*, *cry2*, and *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* isolates from China. *J. Invertebr. Pathol.* 82: 63-71.
- Wasano, N., Ohba, M. 1998. Assignment of the endotoxin genes of the four Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strains that produce spherical parasporal inclusions. *Curr. Microbiol.* 37: 408-411.
- Wasano, N., Ohba, M., Miyamoto, K. 2001. Two delta-endotoxin genes, *cry9Da* and a novel related gene, commonly occurring in Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* Japanese isolates that produce spherical parasporal inclusions. *Curr. Microbiol.* 42: 129-133.
- Wellman-Desbiens, E., Côte, J. 2004. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Lygus hesperus* (Hemiptera: Miridae) nymphal population. *J. Econ. Entomol.* 97: 251-258.
- Wirth, M., Federici, B., Walton, W. 2000. Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* synergizes activity of *Bacillus sphaericus* against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1093-1097.
- 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: 4653-4662.
- Wu, X., Walker, M., Hornitzky, M., Chin, J. 2006. Development of a group-specific PCR combined with ARDRA for the identification of *Bacillus* species of environmental significance. *J. Microbiol. Methods.* 64: 107-119.
- Xu, C., Wang, B., Yu, Z., Sun, M. 2014. Structural insights into *Bacillus thuringiensis* Cry, Cyt and parasporin toxins. *Toxins.* 6: 2732-2770.
- 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 β -pore-forming toxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 462: 184-189.
- Yilmaz, S., Azizoglu, U., Ayvaz, A., Temizgul, R., Atciyurt, Z., Karabörklü, S. 2017. Cloning and expression of *cry2Aa* from native *Bacillus thuringiensis* strain SY49-1 and its insecticidal activity against *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Microb. Pathog.* 105: 81-85.
- Yu, X., Liu, T., Sun, Z., Guan, P., Zhu, J., Wang, S., & Li, P. 2012. Co-expression and synergism analysis of Vip3Aa29 and Cyt2Aa3 insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*. *Curr. Microbiol.* 64: 326-331.
- Zhang, X., Candas, M., Griko, N., Taussig, R., Bulla, L. 2006. A mechanism of cell death involving an adenyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 9897-9902.
- Zhao, J., Li, Y., Collins, H., Cao, J., Earle, E., Shelton, A. 2001. Different cross-resistance patterns in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1C. *J. Econ. Entomol.* 94: 1547-1552.
- Zheng, J., Guan, Z., Cao, S., Peng, D., Ruan, L., Jiang, D., Sun, M. 2015. Plasmids are vectors for redundant chromosomal genes in the *Bacillus cereus* group. *BMC Genomics.* 22: 16:6.

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. 28;5:14129.

Zothansanga, R., Senthilkumar, N., Gurusubramanian, G. 2016. Diversity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from shifting cultivation (Jhum) habitat. Biocontrol Sci. 21: 99-111.