

Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) aptas para el control de plagas agrícolas

Año
2018

Director del proyecto
Palma, Leopoldo

Equipo de investigación
Palma, Leopoldo; Guillen, Joel; Bianchi, Francisco; Allende, María
José y Fissore, Natalia

Alumna participante
Molla, Antonella

Este documento está disponible para su consulta y descarga en el portal on line de la Biblioteca Central "Vicerrector Ricardo Alberto Podestá", en el Repositorio Institucional de la **Universidad Nacional de Villa María**.

CITA SUGERIDA

Palma, L., [et al.] (2018). *Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de Bacillus thuringiensis (Bt) aptas para el control de plagas agrícolas*. Villa María: Universidad Nacional de Villa María





INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

PROYECTO:

Aislamiento y caracterización de cepas autóctonas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) aptas para el control de plagas agrícolas.

DIRECTOR:

Leopoldo Palma

CO-DIRECTOR:

EQUIPO DE INVESTIGACIÓN:

Leopoldo Palma-Joel Guillen-Francisco Bianchi-María José Allende-Natalia Fissore

ALUMNOS INTEGRANTES:

Antonella Molla

1. INFORME ACADÉMICO DEL PROGRAMA/PROYECTO

Durante el desarrollo de este proyecto se procedió a realizar el análisis de muestras de suelo obtenidas de la Estancia Yucat (Villa María), periurbano Villa María y de la localidad Arroyo Cabral, para proceder a realizar el aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). Otras muestras de suelo fueron obtenidas de la localidad de Oncativo (Córdoba) y del campo experimental de la UNVM. Las muestras de la localidad de Oncativo estaban constituidas por suelo provenientes de campos sembrados con alfalfa, maíz y soja. De la UNVM se obtuvieron muestras de suelo tanto del campo experimental como también de la huerta ecológica. Adicionalmente se obtuvieron y analizaron muestras de silos de almacenamiento de granos. A partir de todas las muestras se ha realizado el aislamiento y



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

caracterización microbiológica y microscópica de los correspondientes aislados (búsqueda de los cristales paraesporales típicos). De este trabajo, se obtuvieron 45 aislados con morfología similar a Bt (sospecha de presencia de cristales paraesporales). Estos aislados fueron entonces almacenados en glicerol al 25% (V/V) en freezer para constituir la colección o cepario de bacterias Bt de la UNVM. A estas, se le sumaron 15 aislados adicionales obtenidos anteriormente a la adjudicación de este subsidio de la provincia de Santa Fe, entre los cuales se encuentra una cepa Bt confirmada por presencia de cristales al microscopio. Esta cepa, junto a otra de la colección que demostraba poseer actividad antifúngica, fueron enviadas para su secuenciación genómica a España sin costo alguno gracias a una colaboración establecida con el Dr. Primitivo Caballero (Universidad Pública de Navarra, España). El análisis de la secuencia del genoma del aislado de tipo Bt permitió confirmar su especie como *Bacillus thuringiensis* y reveló la presencia de tres genes con potencial insecticida en su genoma. Esta cepa ha sido denominada Bt-Cul. En base al análisis de la secuencia del genoma del aislado que presentaba actividad antifúngica (1), se la clasifica como *Bacillus cereus*. Esta cepa ha sido denominada CITVM-11.1 y la información contenida en su genoma, ha sido recientemente aceptada para su publicación en el *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (2). Se encontró además, una cepa tipo Bt adicional productora de cristales paraesporales esféricos, la cual fue denominada Bt-84, y que esta siendo actualmente secuenciada en España en colaboración con el Dr. Caballero. Gracias a la financiación obtenida por este proyecto, se pudo además aceptar durante 2 meses, a la estudiante de doctorado Angelika Fiodor desde la Universidad de Byalistok (Polonia). Su estancia motivó además, la firma de un convenio Marco entre la UNVM y la Universidad de Byalistok. La estudiante A. Fiodor desarrolló tareas de búsqueda de cepas Bt y fue enviada además al INTA Castelar con las cepas Bt-Cul y Bt-84 para llevar a cabo en colaboración con el Dr. Diego Sauka, la caracterización preliminar de su actividad insecticida. Con la cepa Bt-Cul y Bt-84 se realizaron bioensayos cualitativos de toxicidad empleando larvas de segundo estadio de *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae), neonatas de *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae) y neonatas de *Spodoptera cosmioides* y *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae), y del nematodo de vida libre *Panagrellus redivivus*. Adicionalmente, se llevó a cabo la detección cualitativa de la producción de beta-exotoxina determinando los adultos de *Musca domestica* que emergían post-tratamiento y mediante la detección por PCR del gen *thuE*. La cepa Bt-Cul resultó altamente tóxica para *S. cosmioides*, moderadamente tóxica para *C. pomonella*, levemente tóxica para *A. diaperinus* y *A. grandis*, y atóxica para *P. redivivus*. La cepa Bt-84, no resultó tóxica para ninguna de las anteriores. Tanto la cepa Bt-Cul como Bt-84



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

demonstraron no ser productoras de beta-exotoxina, ni portar los genes asociados a su producción. Sin embargo, investigaciones adicionales están siendo llevadas a cabo actualmente con el objeto de poder establecer el verdadero potencial insecticida de las cepas Bt-Cul y Bt-84. La cepa Bt-84 producía cristales de morfología esférica, los cuales, según la literatura científica, están asociados a actividades insecticidas contra moscas y mosquitos (dípteros). Que ninguna de las cepas produzca beta-exotoxina, sería una cualidad deseable en un nuevo bioinsecticida ya que para estas toxinas, no se ha podido descartar su actividad contra mamíferos. Por último, podemos mencionar que los resultados obtenidos hasta la fecha para la cepa Bt-cul han sido enviados y aceptados para su publicación (formato póster) al IV Congreso Argentino de Microbiología Agrícola y Ambiental (CAMAYA) (3).

Referencias

1. Felipe V, Palma L, Yaryura P. 2016. Antagonistic activity of *Bacillus* sp. strain isolated in Córdoba, Argentina against *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid. *Rev Argent Microbiol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2016.08.008>.
2. Caballero J., Peralta C., Molla A., Del Valle E., Caballero P., Berry C., Felipe V., Yaryura P., Palma L. 2018. Draft genome sequence of *Bacillus cereus* CITVM-11.1, a strain exhibiting interesting antifungal activities. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* (en prensa).
3. Antonella Molla, Diego Sauka, Angelika Fiodor, Melisa Pérez, María I. Onco, Del Valle E., Javier Caballero, Cecilia Peralta, Primitivo Caballero, Leopoldo Palma. 2018. Secuenciación genómica y caracterización toxicológica de *Bacillus thuringiensis* Bt-cul (aceptado IV congreso CAMAYA).

2. VINCULACIÓN CIENTÍFICA

2.1. *Describir vínculos generados desde el Programa/Proyecto con referencia a demandas del Sector Productivo.*

Durante el desarrollo de este proyecto, se generaron vínculos de colaboración con personal jerárquico de las empresas Naturalis, productora de insecticidas biológicos de la empresa Formulagro y con la empresa Agidea. Con estos resultados y la colaboración del Licenciado



INFORME ACADÉMICO FINAL

Proyectos de Investigación 2016-2017

Gustavo Chacón (Naturalis), Federico Ocampo (Agidea) y Diego Sauka (INTA Castelar) se solicitó y se obtuvo un subsidio Universidades Agregando Valor 2017 (Inv. responsable Dr. Palma). RESOL-2017-5157-APN-SECPU#ME. Monto: \$150.000. Duración: 1 AÑO.

2.2. Describir vínculos que respondan a demandas internas de distintas áreas de la UNVM.

Se generaron vínculos de cooperación con los Dres. Verónica Felipe y Pablo Yaryura. De su colección bacteriana enviamos a secuenciar el genoma de una cepa de *Bacillus subtilis* denominada TVM05, sin costo, gracias a una colaboración pre-establecida por el Dr. Palma y su antiguo director en España, el Dr. Primitivo Cabaleiro (Universidad Pública de Navarra, España).

3. PUBLICACIÓN EN REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM

AUTORIZO LA PUBLICACIÓN DE ESTE INFORME ACADÉMICO FINAL EN EL REPOSITORIO DIGITAL DE LA UNVM: SI