

Informe final publicable de proyecto

Mejoramiento de cepas de *Beauveria bassiana* para el control biológico de la chinche de la soja, *Piezodorus guildinii*

Código de proyecto ANII: FMV_1_2021_1_169591

Fecha de cierre de proyecto: 01/04/2025

ABREO GIMENEZ, Eduardo Raul (Responsable Técnico - Científico)

OBERTI RIVAROLA, Hector Luis (Investigador)

PEDRINI, Nicolas (Investigador)

SESSA JUSID, Lucía Olga (Investigador)

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS (Institución Proponente) \\ UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA \\ INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIÓN AGROPECUARIA. INIA LAS BRUJAS

Resumen del proyecto

Piezodorus guildinii es uno de los insectos más dañinos que afectan a la soja en el sur de Estados Unidos, Argentina y Uruguay. Su control se basa en insecticidas químicos, a los que presenta resistencia. Beauveria bassiana es una especie de hongos entomopatógenos con un rango de hospedadores de más de 700 especies. Sin embargo, P. guildinii es altamente resistente a este biocontrolador natural y no se han reportado eventos epizooticos. Debido a esto, se buscó mejorar cepas de Beauveria bassiana disponibles para mejorar su actividad como agentes microbianos de control biológico. Para ello, fue necesario inicialmente identificar los genes implicados en la virulencia, con un foco principal en genes que pudiesen explicar la diferencia de virulencia entre dos cepas con virulencia contrastante. Con base en los genomas ensamblados y anotados de ILB205 e ILB308, realizamos un estudio comparativo de genomas entre las dos cepas. Además, analizamos las diferentes respuestas de expresión de estos aislados durante la interacción con la cutícula del insecto, o sus componentes, y durante la infección de P. guildinii. Esto se utilizó con el fin de encontrar genes de virulencia candidatos que pudiesen emplearse en procedimientos de mejora de cepas. En base a un set de aproximadamente 600 candidatos, se generaron cepas mutantes knock-out para verificar la acción de los genes candidatos que surgieron de la genómica comparativa y el análisis transcriptómico. Después de esto, la sobreexpresión de genes considerados importantes para la patogenicidad se llevó a cabo como prueba de concepto, buscando potenciar la virulencia de las cepas. A futuro, se continuará con la estrategia de hibridación mediante fusión de protoplastos para generar una progenie que lleve los genes de interés sin transgénesis. La presencia de estos genes se rastreará mediante PCR y la expresión mediante RT-qPCR y su efecto se probará en bioensayos en condiciones de laboratorio. También, se sentaron las bases para explorar la utilización de metabolitos secundarios y proteínas secretadas vinculadas a virulencia diferencial de las cepas como mejoradores de la virulencia mediante su aplicación combinada. Finalmente, se estableció la línea base de la efectividad de un formulado de la cepa original ILB308 en condiciones de campo controladas (semi-campo).

Ciencias Agrícolas / Agricultura, Silvicultura y Pesca / Agronomía, reproducción y protección de plantas / Microbiología

Palabras clave: entomopatógeno / hongo / soja /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

El gran problema es el de la sustentabilidad de los cultivos extensivos, en particular la soja y el requerimiento de aplicación de insecticidas para el control de la chinche P. guildinii. Esta chinche es el principal y más dañino insecto en el cultivo de soja en Uruguay, Argentina, Brasil y EEUU ya que se alimenta de los granos durante la etapa de llenado (Zerbino et al 2015). En Uruguay, el cultivo ocupa aproximadamente 1 millón de hectáreas y requiere de repetidas aplicaciones de insecticidas, alguno de los cuales han sido asociadas a la aparición de insectos con mayor resistencia a los principios activos en uso (Sessa et al. 2021). En particular, no se dispone de controladores biológicos eficientes que puedan ser usados para sustituir al menos parcialmente, algunos de los principios activos actualmente en uso. Este proyecto buscó obtener una cepa mejorada del controlador B. bassiana, a partir de dos cepas que han demostrado previamente que tienen un cierto nivel de efectividad sobre la misma en ensayos in vitro (Sessa et al. 2022) Al desafío productivo-ambiental causado por la chinche de la soja, subyace entonces el problema del difícil control biológico de esta chinche, que ha conducido a proyectos anteriores de nuestro grupo buscando la selección de cepas de hongos entomopatógenos y posteriormente el mejoramiento de la fisiología de dichas cepas. En esta tercera etapa, buscamos realizar un mejoramiento de las cepas previamente seleccionadas, de manera de aumentar su virulencia hacia P. guildinii. Las cepas de B. bassiana ILB205 e ILB308 y la información sobre ellas obtenida en los proyectos anteriores (virulencia y expresión de genes) (Sessa et al 2021) fueron el recurso sobre el cual se trabajó en este proyecto buscando combinar características de estas cepas para disponer de agentes de control biológico con actividad mejorada sobre P. guildinii. En paralelo, se realizaron ensayos de campo en condiciones controladas (semi-campo) para evaluar la efectividad de diferentes tecnologías de aplicación de la cepa original de mayor virulencia que sirviera como antecedente aplicado de la actividad en un entorno relevante de la tecnología en desarrollo.

Metodología/Diseño del estudio

La estrategia implicó combinar datos de secuenciación masiva (genómica y ARN-seq interacción hongo-insecto), predicción in silico de factores de patogenicidad y métodos de transformación genéticas como prueba de concepto de la posibilidad de obtener una cepa con virulencia mejorada. En base a las diferencias de virulencia y otras características fenotípicas de estas cepas, se buscó identificar genes vinculados a las mismas, que puedan ser combinados en una nueva cepa, con virulencia aumentada. Inicialmente, se obtuvieron datos de expresión mediante ARN-seq durante la infección a P. guildinii de la cepa ILB308 y en medios axénicos de las cepas ILB308 e ILB205. Los genes de mayor expresión en la cepa ILB308 fueron seleccionados para knock-out y su posterior sobre-expresión mediante técnicas de ingeniería genética. Luego, las cepas mutantes y sin transformar fueron sujetas a bioensayos verificadores de la pérdida o aumento de virulencia en condiciones de laboratorio. Los bioensayos fueron realizados siguiendo la metodología de Sessa et al (2022).

En paralelo, se realizaron bioensayos con las cepas más virulentas ILB308 original en condiciones de semi-campo, colocando 10 chinches por planta y 5 plantas por tratamiento. Esto se realizó con el fin de evaluar el efecto de un formulado obtenido según Abreo et al (2019), y aplicado en un entorno relevante, es decir, en condiciones de producción, sujeto a las condiciones ambientales variables y sin aplicación de insecticida, para establecer una línea base de virulencia de un formulado de la cepa con mayor actividad.

Resultados, análisis y discusión

El genoma de la cepa ILB308 mostró el mayor número de características relacionadas con la virulencia, como proteínas candidatas, efectores, pequeñas proteínas secretadas y grupos de genes biosintéticos. Además, ILB308 presentó un alto porcentaje de secuencias de ADN únicas, incluyendo seis regiones genómicas accesorias. El análisis de la expresión génica a los 4 días post-inoculación reveló una sobre-expresión de factores de virulencia secretados conocidos, como proteínas con dominio Tudor, proteínas que contienen motivos LysM, proteasas similares a subtilisinas y genes novedosos que codifican efectores secretados y enterotoxinas sensibles al calor. El crecimiento en medio suplementado con n-pentadecano (HC15) condujo a la sobre-expresión de genes asociados con la actividad oxidoreductasa relacionada con la degradación de alcanos cuticulares y respuestas de fermentación/metabolismo antioxidante en el hemolinfa. El bajo número de genes de virulencia conocidos expresándose durante la infección de P. guildinii en B. bassiana ILB308 sugiere la existencia de mecanismos novedosos o desconocidos en esta cepa. Además, la presencia de regiones genómicas accesorias y genes de virulencia únicos en ILB308 puede contribuir a su virulencia. Estos genes podrían considerarse como posibles objetivos para potenciar la virulencia fúngica mediante manipulación genética. El análisis transcriptómico entre la cepa de mayor virulencia ILB308 y la cepa de menor virulencia ILB205 reveló genes expresados diferencialmente vinculados a vías de procesos de información genética y evasión del sistema inmune. Entre estos genes, se identificó el gen BbCBM9_1, que codifica una proteína secretada, como un posible factor de virulencia. La sobreexpresión de BbCBM9_1 en la cepa ILB205 condujo a una mayor virulencia contra P. guildinii y Tenebrio molitor, además de mejorar la germinación de conidios, la tolerancia al estrés oxidativo y al estrés en la pared celular, así como un aumento en el crecimiento en medios ricos en nutrientes y suplementados con glicerol. Esto demuestra que la mayor virulencia observada en ILB308 cultivada en HC15 puede ser replicada mediante la sobreexpresión de un gen asociado en una cepa de baja virulencia. Nuestro estudio destaca el potencial de integrar la genómica, transcriptómica y modificaciones genéticas dirigidas para optimizar agentes fúngicos de control biológico y mejorar la gestión de plagas. La inclusión de la cepa original ILB308 en un formulado seco y su evaluación en condiciones de campo permitieron establecer una línea de base de su efectividad en condiciones relevantes, alcanzando una mortalidad que osciló entre el 20% y el 60% -dependiendo de la concentración- con respecto al control tratado con agua. Si bien el ensayo debe ser repetido para confirmar la efectividad y ajustar aun más la tecnología de aplicación en una extensión mayor del cultivo, los datos obtenidos favorecerán una correcta evaluación de las cepas mejoradas cuando estas se encuentren disponibles. La cepa original ILB308 se encuentra en fase de evaluación no-comercial por una empresa productora de insumos biológicos para la agricultura, por lo cual los conocimientos generados en este proyecto sumarán y potenciarán futuros desarrollos e innovaciones basados en las cepas incluidas en este estudio.

Conclusiones y recomendaciones

Las herramientas ómicas utilizadas sobre el sistema biológico estudiado, definido en función de investigaciones previas, permitió conocer las bases moleculares de la virulencia de cepas locales del hongo entomopatógeno Beauveria bassiana y mediante manipulación genética se pudo demostrar que es posible aumentar la virulencia de las cepas en bioensayos in vitro. En paralelo, se demostró que la cepa original ILB308 en condiciones relevantes (semi-campo) tiene una efectividad aceptable y que ésta podrá verse aumentada cuando se disponga de una cepa mejorada que pueda ser comercializada, es decir, una cuando se disponga de una cepa mejorada no transgénica. Para ello, podrá recurrirse a técnicas de mejoramiento basadas en crispr-cas o fusión de protoplastos sobre las cuales este proyecto ha avanzado. Se prevé continuar con estudios de mejoramiento basados en estas dos últimas técnicas y en el futuro realizar evaluaciones en semi-campo con cepas mejoradas de acuerdo a las reglamentaciones vigentes.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Artículo científico	Novel genomic features in entomopathogenic fungus <i>Beauveria bassiana</i> ILB308: accessory genomic regions and putative virulence genes involved in the infection process of soybean pest <i>Piezodorus guildinii</i> .	Oberti, H., Sessa, L., Oliveira?, Rizzo, C., Di Paolo, A., Sanchez?, Vallet, A., Seidl, M. F., & Abreo, E.	https://doi.org/10.1002/ps.8631	https://ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=ad&id=65046&biblioteca=vazio&busca=Oberti&qFacets=Oberti&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1	Finalizado
Artículo científico	From omics to enhanced fungal virulence: Overexpression of a putative secreted protein improves <i>Beauveria bassiana</i> biocontrol potential against the insect pests <i>Piezodorus guildinii</i> and <i>Tenebrio molitor</i> .	OBERTI, H.; SESSA, L.; VAN ROOSMALEN, E.; DE BEKKER, C.; SEIDL, M. S.; SANCHEZ-VALLET, A.; ABREO, E.	https://doi.org/10.1101/2025.04.02.646755	https://ainfo.inia.uy/consulta/busca?b=ad&id=65173&biblioteca=vazio&busca=Oberti&qFacets=Oberti&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1	En proceso

Referencias bibliográficas

- Abreo, E., Simeto, S., Corallo, B., Martínez, G., Lupo, S., & Altier, N. (2019). Dual selection of *Beauveria bassiana* strains and complex substrate media for the massive production of submerged propagules with activity against the eucalyptus bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*.
- Pedrini N, Ortiz-Urquiza A, Huarte-Bonnet C, Fan Y, Juárez MP, Keyhani NO. Tenebrionid secretions and a fungal benzoquinone oxidoreductase form competing components of an arms race between a host and pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112:E3651–60.
- Pedrini N. Molecular interactions between entomopathogenic fungi (Hypocreales) and their insect host: Perspectives from stressful cuticle and hemolymph battlefields and the potential of dual RNA sequencing for future studies. *Fungal Biol*. 2018;122:538–45. doi:10.1016/j.funbio.2017.10.003.
- Sessa, L., Calderón?Fernández, G. M., Abreo, E., Altier, N., Mijailovsky, S. J., Girotti, J. R., & Pedrini, N. (2021). Epicuticular hydrocarbons of the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* (Heteroptera: Pentatomidae): sexual dimorphism and alterations in insects collected in insecticide?reated soybean crops. *Pest Management Science*, 77(11), 4892-4902.
- Sessa, L., Pedrini, N., Altier, N., & Abreo, E. (2022). Alkane-priming of *Beauveria bassiana* strains to improve biocontrol of the redbanded stink bug *Piezodorus guildinii* and the bronze bug *Thaumastocoris peregrinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 187, 107700.
- Zerbino MS, Altier NA, Panizzi AR. (2015) Seasonal occurrence of *Piezodorus guildinii* on different plants including morphological and physiological changes. *J Pest Sci*. doi:10.1007/s10340-014-0630-2.

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)

