

EVALUACIÓN DE AISLAMIENTOS DE *Bacillus thuringiensis* TÓXICOS A *Diatraea saccharalis* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)

Francisco Ramos¹, Artiom Carmona¹, Marie Bères² y Naileth Méndez¹

RESUMEN

La caña de azúcar es uno de los cultivos de mayor importancia en Venezuela. En el país se cultivan alrededor de 120.000 hectáreas y uno de los problemas que enfrenta es el ataque de insectos-plaga, entre los que destaca *Diatraea saccharalis*. Una alternativa para el control de este insecto es mediante el uso de microorganismos tales como *Bacillus thuringiensis*, el agente de control biológico más utilizado contra insectos del orden Lepidoptera. Esta bacteria se caracteriza por la producción de un cristal conformado por proteínas insecticidas denominadas "Cry". En este trabajo se evaluaron siete cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* mediante bioensayos frente a *Diatraea saccharalis* y, utilizando geles de SDS-PAGE, se reconocieron proteínas de aproximadamente 130 kDa en cada una de las muestras. Estas proteínas derivan de una inclusión parasporal de forma bipiramidal típica de las proteínas del tipo Cry1. Los bioensayos señalaron a la cepa HD-1 como la más tóxica, con un 90 % de mortalidad en las larvas, seguida por la cepa UCLA-46 con 73 %. La cepa UCLA-41 mostró sólo 63 % de mortalidad, pero su efecto sobre el crecimiento de las larvas fue similar al de la cepa comercial HD-1.

Palabras clave adicionales: Bioinsecticida, control biológico

ABSTRACT

Search of isolates of *Bacillus thuringiensis* toxic to *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae)

Sugarcane is one of the most important crops in Venezuela. In this country, 120.000 ha are cultivated, and one of the main problems of the crop is caused by insect pests, especially *Diatraea saccharalis*. Microorganisms are utilized as an alternative in the control of such pests. Among them, *Bacillus thuringiensis* is the most commonly used in the control of insects from the order Lepidoptera. This bacterium is characterized by the production of a crystal made of insecticidal proteins called "Cry". In this research, seven native strains of *Bacillus thuringiensis* were evaluated by bioassays against *Diatraea saccharalis* and the analysis of the SDS-PAGE revealed the presence of 130 kDa proteins in each sample. Those proteins come from a bipyrimal parasporal inclusion, typical for Cry1 proteins. Bioassays showed that the HD-1 strain was the most toxic, with 90 % of mortality of larvae, followed by the UCLA-46 strain with 73 %. The strain UCLA-41 showed only 63 % mortality but its effect on larvae growth was similar to the HD-1 commercial strain.

Additional key words: Bioinsecticide, biologic control

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar es uno de los cultivos de mayor importancia mundial y nacional. En Venezuela se cultivan alrededor de 120.000 hectáreas; sin embargo, se produce un poco menos del 50% de las necesidades totales del consumo. Uno de los factores que puede contribuir a solventar este déficit es el control de insectos plaga (Ferrer, 2001).

En Venezuela, los taladradores del género

Diatraea, específicamente *Diatraea saccharalis*, conforman una de las plagas más importantes del cultivo de la caña de azúcar. Entre los daños que producen, se puede señalar la disminución del rendimiento y de la calidad del jugo, lo cual se traduce en pérdidas millonarias (Linares, 1987).

Las prácticas para el control de los barrenadores de la caña de azúcar en general son diversas y, si bien los insecticidas sintéticos y los parasitoides son ampliamente utilizados, se cuenta con otras alternativas, tales como: uso de

Recibido: Abril 15, 2004

Aceptado: Septiembre 6, 2004

¹ Posgrado de Fitopatología, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Apdo. 400. Barquisimeto, Venezuela. e-mail: acarmona @ucla.edu.ve

² Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Estación Local Yaritagua. Yaritagua estado Yaracuy Venezuela.

microorganismos, prácticas culturales, variedades resistentes y mecanismos legales para tratar de contrarrestar el efecto dañino de esta plaga. Aún así, las pérdidas causadas por *D. saccharalis* son considerables, de ahí la necesidad de buscar nuevas alternativas para su control (Wiedenmann y Smith, 1993; Trabanino, 1999;).

El uso de microorganismos ha resultado una alternativa viable para el control de plagas, siendo los bioinsecticidas a base de la bacteria *Bacillus thuringiensis* los mayormente utilizados para controlar insectos del orden Lepidoptera. Esta bacteria es aeróbica, gram positiva y se caracteriza por la producción de un cristal proteico durante su fase de esporulación, el cual contiene las proteínas insecticidas (Schnepf y Whiteley, 1985). Dicho cristal, al ser ingerido por el insecto, se convierte en una toxina activa (δ -endotoxina) en el intestino, formando en él canales iónicos que permiten el libre flujo de iones, lo cual produce un desbalance osmótico en las células afectadas y la destrucción del epitelio intestinal, causando finalmente la muerte del insecto (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf et al., 1998; Maagd et al., 2003).

En Venezuela se han realizado aislamientos de *B. thuringiensis* (Bt) de diversas muestras de suelo, encontrándose la existencia de aislados nativos con un potencial para ser utilizadas en el control biológico de insectos (Bullé, 2002; Carmona, 2002).

Muchos de los genes que codifican para las toxinas que produce esta bacteria ya han sido clonados y caracterizados; sin embargo, los reportes sobre nuevas toxinas de Bt son frecuentes, por lo que en la actualidad se conocen más de 288 proteínas insecticidas de esta bacteria, y la posibilidad de seguir encontrando nuevas toxinas es alta (Crickmore et al., 1998). La importancia de estas toxinas radica no sólo en su uso como bioinsecticidas, sino que la clonación de sus genes y su integración al genoma de plantas cultivadas ha permitido el desarrollo de variedades transgénicas que producen su propio insecticida (Lambert y Peferoen, 1992; Schnepf et al., 1998). Cualquier programa de desarrollo de plantas transgénicas productoras de toxinas de Bt debe estar precedido por una selección de la o las toxinas más potentes hacia la plaga que se desea controlar.

En este trabajo se evaluaron 7 cepas nativas de

Bacillus thuringiensis mediante bioensayos frente a *Diatraea saccharalis* y se describieron parcialmente mediante su patrón de proteínas. Las nuevas cepas fueron contrastadas contra la cepa estándar denominada *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las colonias bacterianas fueron aisladas de muestras de suelo provenientes de los estados Lara y Portuguesa en Venezuela, de acuerdo a la técnica descrita por Martin y Travers (1989). Por otra parte, las muestras de suelo provenían de campos en los que no se habían realizado aplicaciones previas de insecticidas a base de *B. thuringiensis*. Estas colonias fueron ingresadas al cepario del laboratorio de Biología Molecular de los Postgrados de Agronomía, de la UCLA-Barquisimeto. Con el objeto de evitar trabajar con muestras idénticas o colonias hermanas, se seleccionaron colonias que derivaran de distintas localidades (Cuadro 1). La identificación de cada aislado se hizo bajo el microscopio de luz con contraste de fase (1000x).

Cuadro 1. Distribución de las muestras por localidades

Aislamiento bacteriano	Región
UCLA-13	Portuguesa
UCLA-16	Portuguesa
UCLA-28	Portuguesa
UCLA-41	Portuguesa
UCLA-46	Lara
UCLA-76	Lara

Obtención del complejo espora-cristal

Para la obtención del complejo espora-cristal, las cepas fueron cultivadas en 50 ml de leche peptonizada (leche peptonizada, 10 g; dextrosa, 10 g; extracto de levadura, 2 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,3 g; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 20 mg; $MnSO_4$, 20mg; 1 litro agua; pH 7,2-7,5), con agitación a 340 rpm y 28 °C durante 48 ó 72 horas hasta la autólisis (liberación al medio de los cristales y esporas). Posteriormente se lavó tres veces por centrifugación con NaCl 1,5 M, con el objeto de disminuir la actividad proteolítica y evitar la posible degradación de las proteínas del cristal insecticida. Finalmente, el precipitado obtenido fue congelado y liofilizado.

Patrón de péptidos

Para el análisis del patrón de las proteínas se utilizó la técnica de electroforesis en geles desnaturizantes de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970; Schägger y von Jagow, 1987). Se utilizó 4 y 10% de acrilamida para los geles de concentración y de separación, respectivamente.

De cada muestra liofilizada de complejo espora-cristal de las cepas estudiadas, se pesó una cantidad apropiada y se preparó una suspensión de 0,5 mg·ml⁻¹ para cargar una cantidad similar de cada muestra en el gel de poliacrilamida y finalmente realizar la separación de las proteínas (Carmona, 2002). Los pesos moleculares de las proteínas se estimaron utilizando el marcador de peso molecular BenchMark Protein Ladders de la casa comercial Gibco BRL. La electroforesis se realizó con un potencial eléctrico de 50 Volts durante 30 min y posteriormente a 100 Volts por 1h y 30 min, utilizando una solución amortiguadora de corrida a base de Tris-glicina y SDS (Tris-Base 0,05 M, glicina 0,38 M, SDS 0,1%, pH 8,8). Las proteínas se visualizaron tiñendo los geles con azul brillante de Coomassie R al 0,1 %.

Bioensayo

El efecto tóxico de la proteína de *B. thuringiensis* fue evaluado utilizando larvas del primer instar de *Diatraea saccharalis* de tamaño uniforme, criadas durante 24 horas con dieta artificial, para minimizar el efecto de mortalidad neonatal. Cada muestra liofilizada se resuspendió en agua destilada estéril conteniendo Tween 20 al 0,02 %, y se incorporaron 500 µg·cm⁻³ de complejo espora-cristal de cada muestra o tratamiento en la dieta artificial. La cepa HD-1 utilizada como control positivo, fue tomada del producto comercial Dipel (Abbott Laboratories) que contiene 6 % de ingrediente activo, complejo espora cristal. Se utilizaron 30 larvas por tratamiento, realizando un total de tres repeticiones independientes. El testigo negativo contenía agua destilada estéril y Tween 20 al 0,02 %. La mortalidad fue registrada a los 5 días después del tratamiento al igual que el efecto sobre el crecimiento. Los resultados fueron analizados utilizando el programa estadístico SPSS (versión 9).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de colonias

Cada aislado fue evaluado bajo el microscopio de luz, en contraste de fase, para corroborar en cada uno de ellos la presencia de una inclusión cristalina al lado de la espora. La existencia de tal estructura cristalina indicó estar en presencia de aislados de *Bacillus thuringiensis* y la forma bipiramidal de esta inclusión indicó que los aislados evaluados pertenecen al patotipo I de Bt, tóxico al orden lepidóptero, lo cual concuerda con lo reportado por diversos autores (Höfte y Whiteley, 1989; Maciel-Rosas et al., 1994; Maagd et al., 2003).

Patrón de proteínas

En este estudio es clara la presencia, en todas las muestras evaluadas, de una banda mayoritaria de aproximadamente 130 kDa, la cual coincide con la banda observada en la cepa HD-1 (Figura 1) la cual fue utilizada como patrón de comparación y cuyo cristal bipiramidal lo conforman 3 tipos de proteínas insecticidas Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac de 133,2; 131,0 y 133,3 kDa, respectivamente. Esta cepa HD-1, también posee una inclusión cúbica la cual esta formada por la proteína Cry2A con un peso molecular que está en el rango de 71 kDa y con una actividad tóxica dual contra lepidópteros y dípteros (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf et al., 1998). En nuestro caso, podemos relacionar esta banda, por extrapolación a la cepa HD-1, con la proteína insecticida contenida en la inclusión bipiramidal observada bajo el microscopio. En casi todas las muestras evaluadas, se observa la existencia de otra banda importante de 70 kDa, la cual pudiera ser asociada con la proteína Cry2A. Sin embargo, en ninguna de las muestras estudiadas se evidenció a presencia de una inclusión cúbica similar a la de la cepa HD-1, que contiene la proteína Cry2A. La existencia de esta banda de aproximadamente 70 kDa, pudiera estar relacionada con la posible degradación de la proteína de 130 kDa, lo cual ha sido reportado anteriormente por otros autores (Bietlot et al., 1990; Du et al., 1994; Carmona e Ibarra, 1999).

Actividad biológica de los aislados

Es importante señalar que *B. thuringiensis* presenta mayor toxicidad en los primeros instares

larvarios de los insectos susceptibles, de tal forma que son este tipo de larvas las que permiten realizar con mayor facilidad los bioensayos para determinar la toxicidad de esta bacteria (Höfte y Whiteley, 1989; Maciel-Rosas et al., 1994). Las pruebas toxicológicas realizadas fueron del tipo cualitativo, mostrando la existencia de diferentes grados de actividad insecticida de las cepas evaluadas, frente a *Diatraea saccharalis* (Cuadro 2). Está bien documentado que las proteínas de ~130 kDa presentes en la cepa HD-1 son responsables de la actividad tóxica de esta

bacteria (Höfte y Whiteley, 1989; Schnepf et al., 1998), por lo que en cada una de las cepas estudiadas se puede relacionar la proteína de este rango de peso con la proteína insecticida involucrada con la actividad tóxica encontrada. Por otra parte, la forma bipiramidal del cristal parasporal, observado en cada una de las cepas, está relacionada con proteínas de los pesos moleculares en el rango de 130-140 kDa, como han reportado otros autores (Maciel-Rosas et al., 1994; Schnepf et al., 1998; Maagd et al., 2003).

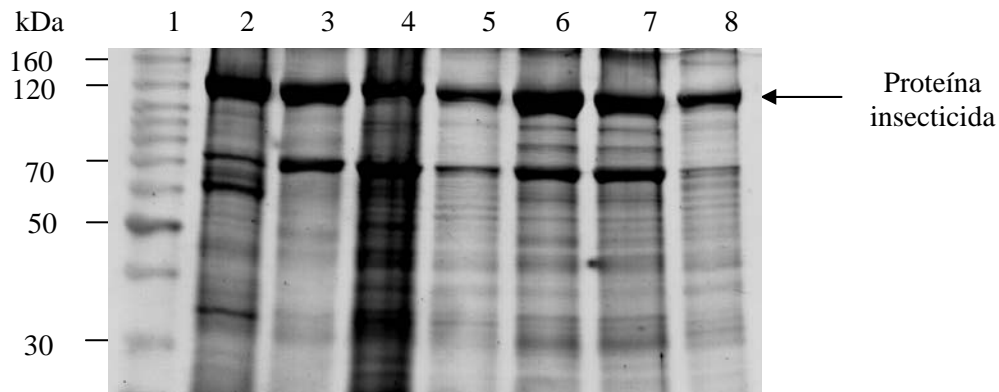


Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE mostrando el patrón de proteínas del complejo espóra-cristal de *B. thuringiensis*. Líneas: 1 = Marcador de peso molecular en kilodalton, 2 = HD-1, 3 = UCLA-13, 4 = UCLA-16, 5 = UCLA-28, 6 = UCLA-41, 7 = UCLA-46, 8 = UCLA-76

Los bioensayos realizados indican que la cepa HD-1 presenta la mayor toxicidad, de 90%, seguida por la cepa UCLA-46 con un 73% de mortalidad (Cuadro 2). Es importante destacar, que las cepas UCLA-76, UCLA-28, UCLA-41, UCLA-13 y UCLA-46, a pesar de mostrar porcentajes de mortalidad significativamente menores a los del control positivo, produjeron un efecto deletéreo sobre el crecimiento de las larvas de *D. saccharalis*, similar al expresado por la cepa comercial HD-1 (Cuadro 2). Si bien una elevada mortalidad de larvas es el efecto más deseado en una cepa promisoriosa para el control de un insecto, su influencia sobre el crecimiento de las mismas puede ser también de gran importancia. En efecto, un deterioro del desarrollo de las larvas, está directamente relacionado con su capacidad para completar exitosamente el proceso de metamorfosis, influyendo así directamente sobre su viabilidad y consecuentemente en perjuicio de la población del insecto (Ibarra y

López-Meza, 1997).

Cuadro 2. Efecto tóxico de las cepas de Bt sobre larvas de *D. saccharalis*

Tratamiento	Mortalidad (%)	Peso de larvas (mg)
Control negativo	10 a	2,86 a
UCLA-16	30 b	2,30 b
UCLA-76	50 c	0,11 c
UCLA-28	60 d	0,06 c
UCLA-41	63 de	0,05 c
UCLA-13	67 de	0,07 c
UCLA-46	73 e	0,08 c
HD-1	90 f	0,05 c

Letras diferentes indican medias estadísticamente diferentes según Tukey ($P \leq 0,05$)

En los últimos años, se ha observado la generación de insectos resistentes hacia los productos de Bt, lo cual en cada caso observado, ha sido producto de una inapropiada utilización del producto (Ibarra y López-Meza, 1997). Sin embargo, esto ha evidenciado la vulnerabilidad de

la estrategia de control insecticida que ofrece *B. thuringiensis* (Schnepf et al., 1998; Sayedd et al., 2001). Es posible que la utilización de formulados empleando mezclas de cepas tales como la UCLA-46 y las cepas UCLA-76, UCLA-28, UCLA-41 o UCLA-13, puedan servir como alternativas para el manejo de la resistencia en los productos basados en Bt. Se ha propuesto además de la mezcla de cepas, la utilización de dosis subletales para el manejo de la resistencia (Ibarra y López-Meza, 1997). El uso de sinergismo entre distintas proteínas Cry y entre distintos tipos de control, como es el uso de hongos entomopatógenos junto con bacterias como Bt, ha sido sugerido por otros autores como una alternativa para mejorar la eficiencia de los controladores biológicos (Lee et al., 1996; Yong-Biao et al., 1998).

De acuerdo con estos estudios preliminares de caracterización de las cepas, resulta evidente la existencia de una gran relación entre la toxicidad observada y la presencia de los genes del tipo Cry1 en las cepas evaluadas. Sin embargo, es necesario profundizar la investigación al respecto, para señalar el tipo preciso de proteína involucrada en este proceso. Es importante señalar que es necesario continuar con la búsqueda de nuevas cepas promisorias para el control de insectos plaga y generar así un banco de cepas con el fin de disponer de un potencial genético necesario para permitir un manejo apropiado de la generación de resistencia hacia Bt.

CONCLUSIONES

La forma bipiramidal de los cristales de cada una de las cepas de *B. thuringiensis* y la presencia de una banda mayoritaria de proteína relacionan las proteínas involucradas con la toxicidad de la familia de las proteínas del tipo Cry1 en un rango entre 130 y 140 kDa.

Las cepas UCLA-76, UCLA-28, UCLA-41, UCLA-13 y UCLA-46 presentaron una respuesta similar al control positivo en el deterioro del crecimiento de las larvas del insecto; sin embargo, UCLA-46 mostró el mayor efecto tóxico sobre las larvas de *D. saccharalis*.

AGRADECIMIENTO

Al Consejo de Desarrollo Científico, Humanístico y Tecnológico (CDCHT) de la

Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA), por el apoyo financiero a través del proyecto AG-036-2001. A la Fundación para el Desarrollo de la Caña de Azúcar (FUNDACAÑA) a través del Ing. Daniel Godoy por la donación de las larvas y la dieta utilizada en los bioensayos.

LITERATURA CITADA

1. Bietlot, H.P.L., I. Vishnubhatla, P.R. Carey, M. Pozsgay y H. Kaplan. 1990. Characterization of the cysteine residues and disulphide linkages in the protein crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. J.* 309-315.
2. Bullé, M. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepas de *Bacillus thuringiensis*, con potencial para el control de plagas en la agricultura. Tesis. Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado” (UCLA). 59 p.
3. Carmona, A. 2002. Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro* 14(1): 3-10.
4. Carmona A. y J. Ibarra. 1999. Expression and crystallization of a Cry3Aa±Cry1Ac chimerical protein of *Bacillus thuringiensis*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 15: 455-63.
5. Crickmore, N, D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum y D.H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.
6. Du, C., P.A.W. Martin y K. W. Nickerson 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 3847-3853.
7. Ferrer, F. 2001. Biological control of agricultural insect pests in Venezuela; advances, achievements, and future perspectives. *Biocontrol News and Information* 22(3): 67-74.
8. Höfte, H. y H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*.

- Microbiological Reviews 53: 242-255.
9. Ibarra J. y J. López-Meza. 1997. Desarrollo de resistencia a *Bacillus thuringiensis*. *Agrociencia* 31: 121-131.
10. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
11. Lambert, B. y M. Peferoen. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* 42: 112-122.
12. Lee, M.K., A. Curtiss, E. Alcántara y D. H. Dean 1996. Synergistic Effect of the *Bacillus thuringiensis* Toxins CryIAa and CryIAC on the Gypsy Moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 583-586.
13. Linares, B. 1987. Estudios sobre los taladradores de la Caña de Azúcar *Diatraea* spp. en Venezuela. Tesis de Maestría: Universidad Central de Venezuela (UCV). Postgrado de Entomología. pp. 219.
14. Maagd, R., A. Bravo, C. Berry, N. Crickmore y H. Schnepf. 2003. Structure, diversity, and evolution of protein toxins from spore-forming entomopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 37: 409-33.
15. Maciel-Rosas, A.M., V.M. Juárez-Pérez, L. Aguilar-Henonín y J.E. Ibarra. 1994. Aislamiento y caracterización de una cepa nueva de *Bacillus thuringiensis* esencialmente inmóvil y altamente tóxica a *Manduca sexta* (Lepidoptera: Sphingidae). *Vedella* 1: 3-12.
16. Martin, P.A.E. y R.S. Travers 1989. Worldwide Abundance and Distribution of *Bacillus thuringiensis* Isolates. *Appl. and Environmental Microbiology* 55: 2437-2442.
17. Sayedd, A. H., N. Crickmore y D.J. Wright 2001. Cyt1Aa from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is toxic to the diamondback moth, *Plutella xylostella*, and synergizes the activity of Cry1Ac towards a resistant strain. *Applied and Environmental Microbiology* 67: 5859-5861.
18. Schagger, H. y G. von Jagow. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166: 368-379.
19. Schnepf, E., N. Crickmore, J. Vanrie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 775-806.
20. Schnepf, E. y H.R. Whiteley 1985. Delineation of a toxin-encoding segment of a *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene. *J. Biol. Chem.* 260: 6273.
21. Trabanino, R. 1999. Manejo integrado de plagas invertebradas en Honduras Zamorano Academic Press. New York.
22. Wiedenmann, R.N. y J. W. Smith Jr. 1993. Functional response of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) at low densities of the host *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol* 22: 849-858.
23. Yong-Biao, L., B.E. Tabashnik, W.J. Moar y R.A. Smith. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1385-1389.