

# EVALUACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* COMO UNA ALTERNATIVA DE MANEJO INTEGRADO DE LA POLILLA DEL TOMATE (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) EN CHILE

## Evaluation of native strains of *Bacillus thuringiensis* as an alternative of integrated management of the tomato leaf miner (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) in Chile

Lorena Niedmann L.<sup>1\*</sup> y Luis Meza-Basso<sup>2</sup>

### ABSTRACT

The tomato moth (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) is the most devastating insect pest of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) crops in Chile, producing losses from 60 to 100% in non-insecticide treated fields. Because pests are evolving to resistance levels to conventional insecticides, there is interest for alternative strategies including the use of biopesticides. In this work the insecticidal potential of native *Bacillus thuringiensis* (Bt) strains against this plague was studied. Bt isolates were collected from soil samples of the VII Region of Chile, and characterized using different criteria: colony and parasporal inclusion morphologies, SDS-PAGE, western blotting analysis and bioassays against *T. absoluta* larvae. Using the Polymerase Chain Reaction (PCR) technique, a genotype classification was performed using specific primers. All the native strains had genes belonging to *cryI* family. Two isolates displayed a relevant toxic activity against *T. absoluta* larvae and could constitute an alternative for controlling this pest. These strains proved to be more effective than the isolate obtained from the commercial Dipel Bt formulation (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*).

**Key words:** *Lycopersicon esculentum*, *Tuta absoluta*, *Bacillus thuringiensis*, biotest, PCR

### RESUMEN

La polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae) es la plaga más devastadora del cultivo del tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en Chile, produciendo pérdidas del 60 al 100% en campos no tratados con insecticidas. Puesto que las plagas de insectos están desarrollando niveles de resistencia a los insecticidas convencionales, existe interés por estrategias de control que incluyen el empleo de biopesticidas. En el presente trabajo se estudió el potencial de aislados nativos de *Bacillus thuringiensis* (Bt) con actividad tóxica contra esta plaga. Los aislados de Bt fueron colectados de muestras de suelo provenientes de la VII Región del país, y fueron caracterizados empleando diferentes criterios: morfología de la colonia y de la inclusión paraesporal, electroforesis en condiciones desnaturantes, análisis Western y bioensayos contra larvas de *T. absoluta*. Usando la técnica Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se obtuvo una clasificación del contenido génico utilizando partidores específicos. Todas las cepas nativas seleccionadas poseían genes de la familia *cryI*. Dos aislados mostraron una actividad tóxica relevante contra la larva de *T. absoluta* y podrían constituir una alternativa para el control de esta plaga. Estas cepas resultaron ser más efectivas que el aislado obtenido desde el producto comercial Dipel (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*).

**Palabras clave:** *Lycopersicon esculentum*, *Tuta absoluta*, *Bacillus thuringiensis*, bioensayos, PCR

<sup>1</sup> Universidad de Talca, Centro de Investigación en Biotecnología Silvoagropecuaria, Casilla 747, Talca, Chile. E-mail: lniedman@utalca.cl

<sup>2</sup> Universidad de Talca, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Casilla 747, Talca, Chile. E-mail: mezabas@utalca.cl

Recibido: 14 de enero de 2005. Aceptado: 22 de abril de 2005.

## INTRODUCCIÓN

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) es una de las principales especies hortícolas cultivadas en Chile. La superficie destinada a este cultivo es aproximadamente de 21.756 ha, con una producción cercana al millón de toneladas (ODEPA, 2005).

La polilla del tomate (*Tuta absoluta* Meyrick) es considerada una de las principales plagas endémicas de los países sudamericanos, ocasionando daños que se estiman del orden del 60 al 100% en aquellos cultivos sin protección contra esta plaga (Larraín, 1986; Giustolin *et al.*, 2001).

El empleo de diversas combinaciones de insecticidas, y en dosis cada vez más crecientes, estaría provocando un incremento de la tasa de aparición de insectos resistentes. En efecto, existen antecedentes acerca del desarrollo de resistencia a insecticidas clorados y fosforados, e incluso hacia los piretroides deltametrina y esfenvalerato (Salazar y Araya, 1997).

Como alternativa al empleo de plaguicidas sintéticos o se ha dirigido la atención a las propiedades insecticidas de ciertos microorganismos o productos microbianos secundarios. El mayor número de especies con propiedades insecticidas pertenece al género *Bacillus*, en especial a la especie *Bacillus thuringiensis* (Bt) (Theoduloz *et al.*, 2003).

El Bt es una bacteria Gram (+) formadora de esporas, que se caracteriza por poseer una variedad de plásmidos que contienen genes que codifican para proteínas insecticidas. Entre éstas, las más estudiadas corresponden a las  $\delta$ -endotoxinas o también llamadas proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998). Estas proteínas son sintetizadas y ensambladas en cuerpos de inclusión paraesporales durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (Höfte y Whiteley, 1989).

Las  $\delta$ -endotoxinas son insecticidas naturales para un gran número de plagas de insectos de importancia agronómica (Aronson y Shai, 2001). Se considera que estos bioinsecticidas son ambientalmente seguros e inoocuos para aves, peces y mamíferos, incluyendo al hombre. Dadas sus notables propiedades, el Bt representa una alternativa útil y complementaria a los insecticidas químicos actuales para el control de algunos insectos fitófagos (Kwang-Bo y Côté, 2002).

Las etapas de acción de este bioinsecticida pueden resumirse en los siguientes eventos: 1) ingesta del cristal proteico; 2) solubilización del cristal en un medio alcalino del intestino; 3) procesamiento proteolítico de la protoxina mediante la acción de proteasas endógenas; 4) unión de la toxina a receptores específicos del epitelio intestinal; y 5) formación de poros y lisis de las células epiteliales (Gill *et al.*, 1992). El insecto hospedero detiene su ingesta de alimento y muere en un plazo de 2 a 6 días (Maagd *et al.*, 2001).

La mayoría de las subespecies de Bt encontradas difieren en su toxicidad y en la gama del insecto hospedero (Yamamoto y Powell, 1993). El conocimiento actual es resultado de intensos programas de búsqueda de nuevas variedades que produzcan proteínas insecticidas con mayores niveles de toxicidad que los descritos. Actualmente, las cepas aisladas muestran un amplio rango de especificidad contra insectos de diferente orden (Lepidoptera, Diptera, Coleoptera, Hymenoptera, Homoptera, Phthiraptera y Acari) y otros invertebrados (Nematelminthes y Platyhelminthes) (Feitelson, 1993). El hallazgo de nuevas cepas de Bt que presentan actividades tóxicas duales, hacia más de un insecto hospedero, motivó la actualización de la clasificación de las proteínas larvicidas (Crickmore *et al.*, 1995).

El proceso de caracterización de cepas de Bt puede ser muy diverso, sin embargo, el criterio más utilizado corresponde a la observación morfológica del cristal paraesporal, como también el perfil de proteínas conseguido mediante electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los objetivos principales de este trabajo fueron: 1) aislamiento y caracterización de nuevas cepas de Bt en los suelos de la VII Región, y 2) evaluación de su acción insecticida contra la larva de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrick.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica Vegetal, Instituto de Biología Vegetal y Biotecnología, Universidad de Talca, Talca, Chile, entre el año 2002 y el año 2003. Se cultivaron plantas de tomate del híbrido SSC445, bajo condiciones controladas de luz, temperatura y con un fotoperíodo 16:8 (luz:oscuridad) a una temperatura de 25°C.

La crianza de la larva se efectuó en las dependencias del Laboratorio de Entomología de la Universidad de Talca, bajo condiciones controladas. Las larvas se desarrollaron sobre plantas de tomate del híbrido SSC445. El inóculo inicial provenía desde invernaderos ubicados en la comuna de Penciahue (35° 23' lat. Sur, 71° 50' long. Oeste), VII Región del Maule.

#### **Aislamiento de las cepas de Bt**

Las cepas de Bt se aislaron de muestras de suelo extraídas desde diferentes sistemas agroecológicos de la VII Región del país (Vásquez *et al.*, 1995). El procesamiento de estas muestras se realizó de la siguiente manera: un g de suelo se mezcló con 10 mL de agua destilada estéril y se pasteurizó a baño maría a 65°C por 30 min. Luego, se dejó en hielo por igual tiempo y de éstos sólo 10 µL se aforaron con agua destilada estéril a un volumen final de 200 µL. Esta suspensión se depositó en placas con agar LB (Luria Bertani) (10 g triptona, 5 g extracto levadura, 10 g NaCl, por litro) y se dejaron crecer en una cámara a 28°C.

Las cepas que crecieron en el medio LB con características morfológicas similares a Bt se cultivaron aisladamente en un agar nutritivo hasta su autólisis a una temperatura de 28°C. Con el cultivo autolizado se preparó un frotis delgado sobre un portaobjeto. El material fijado se cubrió con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% en 50% de etanol y 7% de ácido acético durante 10 min. Se lavó el exceso de colorante con agua y se dejó secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observaron con microscopio óptico (Nikon E-4000, Tokio, Japón) con 1250X de aumento.

Como cepa control se utilizó la cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que se regeneró a partir del producto comercial Dipel® 2X (Laboratorios Abbott, Chicago, EE.UU.). Este procedimiento consistió en tomar una cantidad pequeña del producto para restablecer su crecimiento en una placa con medio LB.

#### **Purificación de cristales (δ-endotoxinas)**

Las cepas se cultivaron en leche peptonizada (PMB) (10 g leche peptonizada; 10 g dextrosa; 2 g extracto levadura; 0,3 g MgSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 0,02 µg mL<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 0,02 µg mL<sup>-1</sup> ZnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O; 0,020 µg mL<sup>-1</sup> MnSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O en un volumen final de un litro), con agitación constante de 300 rpm a 28°C, hasta su completa autólisis. Posteriormente, el sedimento se colectó por centrifugación a 10.000 rpm por 10 min,

y se lavó tres veces con agua destilada estéril, eliminándose el sobrenadante en cada oportunidad. El sedimento resultante se resuspendió en NaCl 0,5 M a 30°C por 15 min. Enseguida, el sedimento se resuspendió en un volumen de PMSF (fenilmetil-sulfonil fluoruro) 1 mM y la suspensión se sometió a un gradiente lineal de NaBr, preformado entre 30 y 60% (Vásquez *et al.*, 1995). La centrifugación se realizó a 10.000 rpm por 2 h a 4°C, utilizando una centrífuga refrigerada (Sorvall, modelo RC-5B, Wilmington, Delaware, USA). Al término de la centrifugación, la banda de cristales se extrajo con una pipeta Pasteur, se diluyó con agua destilada, y se concentró por centrifugación. Luego los cristales se lavaron dos veces con agua destilada estéril y se recuperaron, en cada ocasión, por centrifugación. Finalmente, los cristales se congelaron a -80°C para luego ser liofilizados y almacenados a 4°C, hasta su utilización.

#### **Tinción del cuerpo paraesporal**

Se preparó un frotis delgado sobre un vidrio portaobjeto, secándolo a temperatura ambiente y luego, exponiéndolo suavemente a la llama del mechero. El material fijado se cubrió con una solución de azul de Coomassie R-250 al 0,25% en 50% de etanol y 7% de ácido acético durante 10 min. Se lavó el exceso de colorante con agua y se dejó secar el frotis a temperatura ambiente. Los cuerpos paraesporales se observaron al microscopio óptico (Nikon E-4000) con 1250X de aumento.

#### **Microscopía electrónica de los cristales proteicos**

Una identificación más fina del cuerpo paraesporal se efectuó mediante observación al microscopio electrónico de barrido (MEB) (Philips, Modelo XL-30-ESEM, Irapuato, México), gentilmente facilitado por el Centro de Investigación de Estudios Avanzados Querétaro, México.

Se tomaron alícuotas de 10 µL a partir de suspensiones de esporas y cristales. Éstas se distribuyeron en la superficie de portaobjetos cilíndricos de aluminio, diseñados especialmente para observar en el MEB.

Una vez que las muestras se secaron, se llevaron a sombrear con oro por 4 min en un sombreador de oro (E.F. Fullam, Modelo EMS-76M, California, USA), utilizando una corriente de 10 A y una bomba de vacío de alto poder conectada al sombreador, hasta alcanzar un vacío de 200 µTorr.

Después de concluir el sombreado, se tomaron los portaobjetos con unas pinzas de plástico y se colocaron en una caja de Petri que contenía cinta adhesiva, para transportar así las muestras hasta el MEB.

### Electroforesis de proteínas paraesporales

La electroforesis analítica de proteínas se realizó en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes, según el procedimiento descrito por Laemmli (1970).

### Obtención de ADN y amplificación mediante PCR

El aislamiento de ADN de células vegetativas de Bt se realizó mediante la técnica descrita por Ceron *et al.* (1994, 1995). En ésta, las cepas de Bt aisladas se cultivaron durante 12 h en placas con agar nutritivo 23 g L<sup>-1</sup>. Posteriormente, una asada de colonia se transfirió a un tubo Eppendorf con 0,1 mL de H<sub>2</sub>O, y el tubo con la muestra se mantuvo a -75°C por 15 min. Luego, el tubo se calentó a 100°C por 10 min, al término de los cuales las muestras se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm por 10 s (Eppendorf, modelo 5415 C, Berlín, Alemania). Se extrajo una alícuota de 10 µL del sobrenadante y una fracción de esta alícuota se empleó como ADN molde para el análisis de PCR.

Las secuencias específicas de ADN se amplificaron mediante la técnica de PCR (Mullis y Faloona, 1987), utilizando partidores especialmente diseñados (Ceron *et al.*, 1994, 1995). Los ADNs moldes analizados se aislaron de las cepas nativas LM-011, LM-012, LM-14 y LM-033. Además, se analizó una cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* del Instituto Pasteur, Francia, y una cepa de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* gentilmente cedida por el Dr. Jorge Ibarra, Instituto de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV), Unidad Irapuato, México. Estas dos últimas cepas se utilizaron como controles de amplificación y ensayo biológico.

El procedimiento de amplificación del ADN se realizó en tubos Eppendorf de 100 µL. La mezcla de reacción, en un volumen final de 25 µL, estuvo constituida por los siguientes componentes: 2,5 µL de tampón 10X (121 g TAE 50 X = trizma base; 28,6 mL ácido acético glacial; EDTA 0,5 M, pH 8,0 y agua ultra pura, por litro), 2,5 µL MgCl<sub>2</sub> 2 mM, una solución de desoxinucleótidos trifosfato (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) en una concentración individual final de 0,2 mM; partidores generales y espe-

cíficos a una concentración de 0,2 µM y 1,25 U de *Taq* polimerasa. Por ensayo se utilizaron 100 ng de ADN purificado por el procedimiento descrito anteriormente. La amplificación se efectuó utilizando dos programas, ambos descritos por Ceron *et al.* (1994, 1995).

Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa (García, 2000) al 3% p/v en solución amortiguadora TAE 1X.

### Análisis Western

El análisis inmunológico de las δ-endotoxinas de las cepas de Bt se realizó utilizando anticuerpos policlonales contra la toxina de 130 kDa de la cepa de referencia var. *kurstaki* HD-1, desarrollados en conejo (Meza-Basso *et al.*, 1993). Las proteínas separadas en geles de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa y se procesaron de acuerdo al procedimiento descrito por Tsang *et al.* (1983).

### Bioensayos

Se prepararon placas Petri (6 cm diámetro) con una hoja de tomate en su interior fenológicamente iguales y sin previa aplicación de plaguicida. Las hojas se lavaron con agua y Tween 20 al 0,3% y luego se secaron con papel absorbente. Cada hoja se sumergió y agitó suavemente por 2 min en las diferentes concentraciones de protoxina aislada del Bt en estudio, se secaron sobre una superficie no absorbente y se transfirieron al interior de una placa Petri. Para evitar la deshidratación, se colocó un algodón humedecido con agua destilada al peciolo de cada hoja.

Los insectos para el bioensayo fueron larvas neonatas de *Tuta absoluta*. Se analizaron cinco dosis por tratamiento (1,56; 3,12; 6,25; 12,5 y 25 µg mL<sup>-1</sup>) con 10 larvas cada una. En todos los ensayos se empleó un insecto por placa Petri, por lo tanto, en los análisis cada unidad experimental correspondió a una larva (Jonhson *et al.*, 1991).

Los controles correspondieron a hojas sumergidas en agua destilada estéril ajustada a pH 10,5. Las condiciones del ensayo fueron 25°C, con un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). Las cepas evaluadas fueron las siguientes: LM-011, LM-012, LM-14, LM-033 y *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (Dipel), esta última empleada como control. Cada dosis se

preparó con la proteína liofilizada en 25 mL de agua destilada estéril ajustada a pH 10,5. Se mezcló mecánicamente por 2 h y se incubó a 37°C por 15 h (Theoduloz *et al.*, 2003).

El diseño experimental utilizado fue completamente al azar, con 5 tratamientos y diez repeticiones; la unidad experimental consistió en una larva de *Tuta absoluta*.

La mortalidad se evaluó cada 24 h, siendo la duración del bioensayo 144 h. Los porcentajes de mortalidad se corrigieron de acuerdo a la fórmula de Abbott (Abbott, 1925) y los valores de  $CL_{50}$  (concentración letal 50) y  $TL_{50}$  (tiempo letal 50) se analizaron con el análisis Probit (Moermans y Hecke, 1995), utilizando el programa computacional SPSS 7.0 (SPSS, 1996). Los porcentajes obtenidos de mortalidad para cada cepa se analizaron con el programa computacional NCSS (NCSS, 1997).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

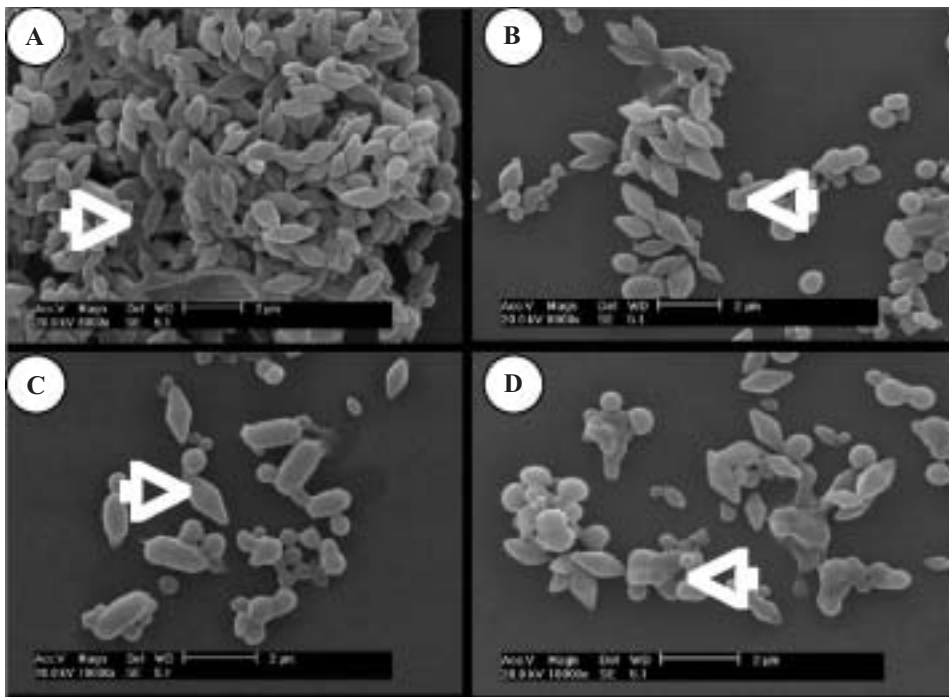
### Aislamiento de cepas nativas

Se aislaron colonias de Bt a partir de muestras de suelo en medio sólido LB. Las colonias rescatadas fueron grandes, de bordes irregulares, opacas, rugosas y sobrelevantadas, propiedades que son características del género *Bacillus*.

Se logró esporulación completa en medio líquido (leche peptonizada) entre 6 y 8 días de cultivo. Al cabo de este tiempo se logró la liberación del cristal tóxico para cada una de las cepas en estudio.

### Microscopía óptica y electrónica

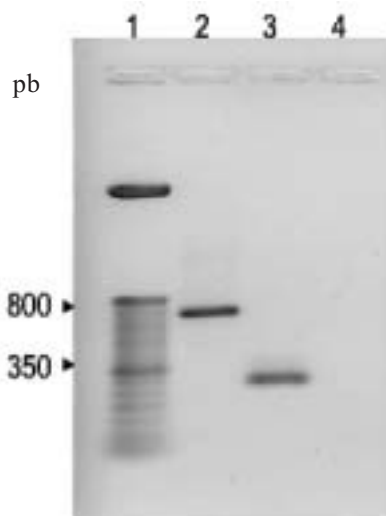
La observación de los cuerpos paraesporales mediante microscopía óptica, comprobó la presencia de abundantes cristales bipiramidales en los cultivos de todas las cepas nativas en estudio (LM-011, LM-012, LM-14 y LM-033), así como en la cepa control Bt var. *kurstaki* HD-1. La Figura 1 muestra



**Figura 1.** Microscopía electrónica de barrido de *Bacillus thuringiensis* cepa LM-033, mostrando la morfología bipiramidal típica de las cepas del patotipo I. A = cristal cuadrado; B = espora; C = cristal bipiramidal; D = posible polihidro-xibutirato (PHB). La barra en cada fotografía representa 2 mm.

**Figure 1.** Scanning electron micrograph of *Bacillus thuringiensis* strain LM-033, showing the typical bipiramidal morphology I pathotype strains. A = square crystal; B = spore; C = bipiramidal crystal; D = a possible polyhydroxybutyrate polihidro-xibutirato (PHB). Scale bar: 2 mm.

el resultado de la microscopía electrónica de barrido efectuada sobre la cepa LM-033. Se aprecian en gran número cristales de morfología bipiramidal y la presencia de algunas esporas. La flecha indica un cristal de forma romboidal que podría corresponder a un cristal proteico Cry3, pero sólo se observa uno. Este resultado podría ser explicado por un bajo nivel de expresión para este gen debido a tres posibles causas: 1) la existencia en algunos casos de un solo promotor, 2) por una pobre estabilización del ARNm, y 3) por una degradación de los nacientes polipéptidos. Lo anterior podría ser atribuido al hecho que estos genes son truncados naturalmente en su zona 3', la cual interviene en la estabilización del ARNm y también facilita la cristalización (Park *et al.*, 1998). Lo anterior explicaría el hallazgo de sólo un cristal de forma romboidal en la microscopía electrónica.



**Figura 2.** Análisis electroforético en un gel de agarosa al 2% de los productos de PCR, usando los partidores generales CJI-1/CJI-2 y CJIII-20/CJIII-21. Carril 1, marcador de peso molecular (50 pb); Carril 2, cepa LM-033 (CJIII-20/CJIII-21); Carril 3, cepa LM-033 (CJI-1/CJI-2); Carril 4, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CJIII20/CJIII21) (Control negativo).

**Figure 2.** Electrophoretic analysis of PCR products in a 2% agarose gel, using the nonspecific primers, CJI-1/CJI-2 and CJIII-20/CJIII-21. Lane 1, 50 pb DNA ladder; Lane 2, strain LM-033 (CJIII-20/CJIII-21); Lane 3, strain LM-033 (CJI-1/CJI-2); Lane 4, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* (CJIII20/CJIII21) (Negative control).

### Determinación del contenido génico mediante la amplificación por PCR

A fin de precisar la naturaleza de los genes *cry* presentes en las cepas nativas de Bt en estudio, éstas fueron analizadas mediante la técnica de PCR, empleando partidores generales y específicos.

En el caso de la cepa LM-033, se observó una banda cercana a los 300 pares de bases (pb) cuando los partidores utilizados fueron los generales CJI-1/CJI-2, y una banda de 700 pb cuando la pareja de partidores empleados fue CJIII20/CJIII21, que son específicos para los genes *cry3*. La existencia de esta banda indicaría que la cepa LM-033 contendría un gen de la familia *cry3*. Sin embargo, el empleo de estos partidores generales no permitió discriminar a cuál subfamilia *cry3* pertenecería. De acuerdo a la información disponible (Ceron *et al.*, 1995) estos partidores reconocen secuencias presentes en los ADNs de las subfamilias *cryIIIA* hasta *cryIIIF* (en nomenclatura nueva *cry3Aa1-cry3Ca1*; *cry7Aa1-cry8Aa1*, respectivamente). Con la pareja de partidores mencionada, los productos de amplificación esperados para estas subfamilias fluctúan entre los 652 pb y los 718 pb. Estas diferencias de tamaño fueron imposibles de resolver mediante el análisis electroforético. Por lo tanto, esta cepa contaría con dos genes *cry*. El primero de éstos podría codificar para toxinas activas contra el Orden Lepidóptera (*cry1*), en tanto, el segundo podría codificar para toxinas activas contra el Orden Coleóptera (*cry3*). Al analizar la cepa *B. thuringiensis* var. *kurstaki* con los partidores CJIII20/CJIII21, no se observó amplificación alguna. Este resultado era esperable, pues esta cepa no posee genes de la familia *cry3*, por tal razón fue ocupada como control negativo (Figura 2).

La mezcla de partidores CJI-CJ7 (MixA) fue ensayada con todas las cepas en estudio. Esta combinación de partidores permite discriminar algunos genes *cry1*. La Figura 3 muestra que los patrones de amplificación de las cepas *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, LM-14 y cepa LM-012 son muy similares, generando productos de amplificación de 250, 216 y 180 pb. La cepa LM-14, además de estos productos de amplificación, presentó una banda tenue a la altura de los 400 pb, que no fue posible de capturar fotográficamente.

Estas tres cepas contendrían genes de la familia *cry1A*, y más específicamente los genes *cry1Aa*,

*cryIAb* y *cryIAc*. Para el caso de nuestra cepa de referencia *kurstaki*, se esperaba la amplificación de estos genes, pues corresponden a su composición génica descrita (Ceron *et al.*, 1994).

Como se observa en la Figura 3, la cepa nativa LM-011 sólo amplificó una banda a la altura de las 216 pb, lo que indicaría que este aislado contendría un gen de la subfamilia *cryIAb*.

La mezcla de partidores CJ8 al CJ13 fue ensayada con todas las cepas en estudio. Esta combinación de partidores permite discriminar otros genes *cryI*. Sólo la cepa LM-14 amplificó una banda de 290 pb (*cryID*) (Figura 4), lo que indicaría la existencia de genes que codifican para las proteínas Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac y Cry1D.

Estos perfiles de amplificación que orientan acerca del contenido génico de cada cepa de Bt en estudio fueron conseguidos con los partidores anteriormente descritos. Sin embargo, los resultados no significan que el contenido génico encontrado para estas cepas sea el definitivo. La amplificación, utilizando otros partidores, podría indicar la presencia de ge-

nes *cry* adicionales a los encontrados. Esta situación explicaría el hecho que cepas que aparentemente tienen los mismos genes, tengan una respuesta diferente ante un mismo insecto blanco. Sin desmedro de lo anterior, se debe considerar que la presencia de un gen *cry*, detectado mediante PCR, no necesariamente significa que ese gen sea expresable y que pueda conducir a la síntesis de la proteína correspondiente. Por otra parte, la región promotora de cada gen individual podría ser más o menos eficiente en promover la transcripción del mismo, dando como resultado que una cepa en particular sintetice proteínas insecticidas de la misma subfamilia o familia, en diferente proporción. De esta forma, cepas con igual contenido génico podrían sintetizar un conjunto de proteínas insecticidas con una composición relativa diferente. Estas diferencias eventuales en la composición relativa podría explicar la respuesta diferencial de su actividad biológica.

#### Electroforesis de proteínas paraesporales

El análisis electroforético de los cristales de cada cepa fue otro criterio de selección, pues permitió visualizar diferencias a nivel del tamaño de las

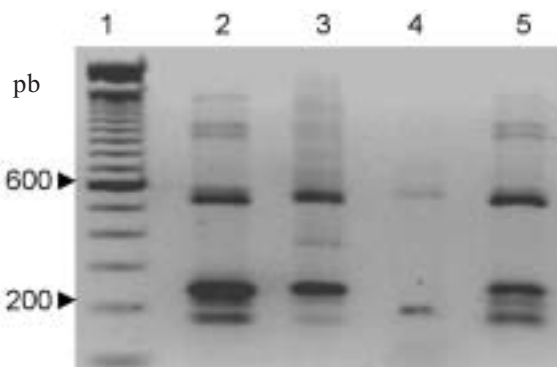


Figura 3 Análisis electroforético en un gel de agarosa al 3% de los productos de PCR, usando el Mix A (CJ1 al CJ7). Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2, cepa *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; Carril 3, cepa LM-14; Carril 4, cepa LM-011 y Carril 5, cepa LM-012.

Figure 3. Electrophoretic analysis of PCR products in a 3% agarose gel, using Mix A (CJ1 to CJ7). Lane 1, 100 pb DNA ladder; Lane 2, strain *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; Lane 3, LM-14 strain; Lane 4, strain LM-011 and Lane 5, strain LM-012.

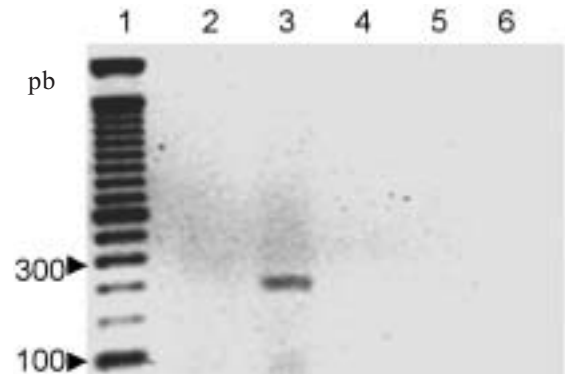


Figura 4. Análisis electroforético en un gel de agarosa al 2% de los productos de PCR, usando el Mix B (CJ8 al CJ13). Carril 1, marcador de peso molecular (100 pb); Carril 2, cepa *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; Carril 3, cepa LM-14; Carril 4, cepa LM-011; Carril 5, cepa LM-012 y Carril 6, control negativo.

Figure 4. Electrophoretic analysis of PCR products in a 2% agarose gel, using a mix of primers (CJ8 to CJ13). Lane 1, 100 pb DNA ladder; Lane 2, strain *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*; Lane 3, LM-14 strain; Lane 4, strain LM-011; Lane 5, strain LM-012 and Lane 6, negative control.

proteínas sintetizadas por la bacteria. De esta forma, se seleccionaron aquellos aislados en que no se repita su perfil electroforético. La Figura 5 muestra que todas las cepas en estudio presentan proteínas que fluctúan entre los 130 a 135 kDa, y se distinguen entre sí, por la presencia de otras bandas de tamaños diferentes.

### Análisis Western

La Figura 6 da cuenta del resultado del reconocimiento inmunológico positivo de todas las cepas nativas en la región de los 130 kDa, exceptuando la muestra proteica proveniente de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* que fue empleada como control negativo. El antisuero reaccionó además con polipéptidos de aproximadamente 65 kDa en el mismo carril.

Adicionalmente, las proteínas cristalinas de la cepa nativa LM-033 fueron analizadas utilizando anticuerpos contra la proteína Cry3A, dando un resulta-

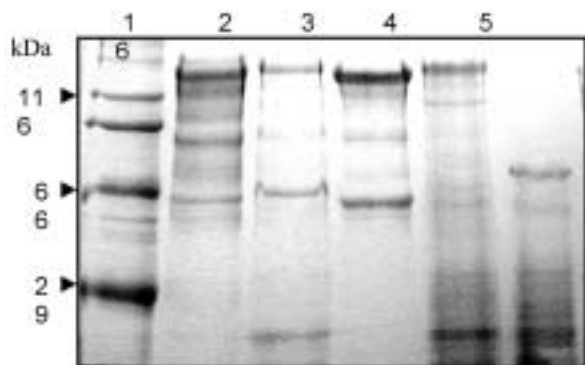


Figura 5. Análisis SDS-PAGE. Carril 1, marcador de peso molecular (SDS-6H): miosina (205 kDa);  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa); fosforilasa (97,4 kDa); albúmina bovina (66 kDa); albúmina huevo (45 kDa) y anhidrasa carbónica (29 kDa); Carril 2, cepa LM-011; Carril 3, Cepa LM-012; Carril 4; cepa LM-14; Carril 5, cepa LM-033 y Carril 6, cepa *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.

Figure 5. SDS-PAGE analysis. Lane 1, molecular weight markers (SDS-6H); myosin (205 kDa);  $\beta$ -galactosidase (116 kDa); phosphorilase (97,4 kDa); bovine albumin (66 kDa); egg albumin (45 kDa) and carbonic anhydrase (29 kDa); Lane 2, strain LM-011; Lane 3, strain LM-012, Lane 4, strain LM-014; Lane 5, strain LM-033 and Lane 6, strain *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*.

do negativo. Vale decir, no fue posible observar la aparición de una banda que indique que esta cepa sintetice esta clase de proteína.

### Bioensayos

En la Figura 7 se observa que todas las cepas estudiadas presentaron una mejor actividad biológica que el control Bt var. *kurstaki*, cepa regenerada desde el producto comercial Dipel, en consideración a que los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron superiores. En el caso de la cepa LM-011, la máxima mortalidad obtenida fue de un 90%, en contraste a la obtenida por el control que sólo alcanzó al 40%. Se aprecia que no existió una correlación entre dosis y porcentaje de mortalidad,

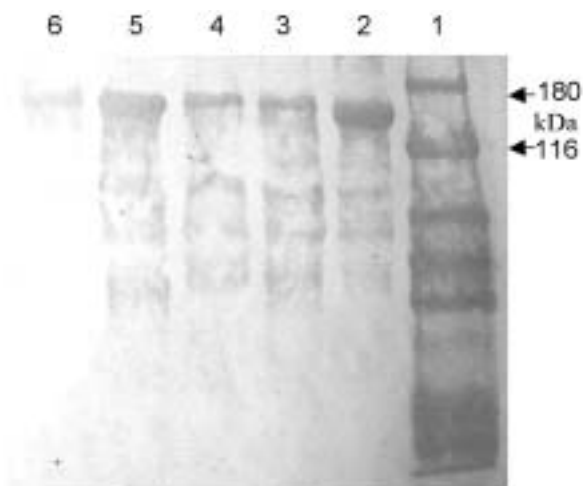
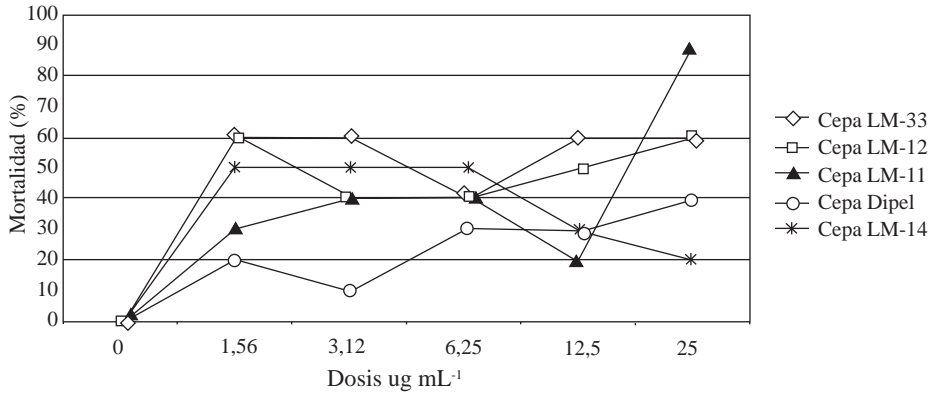


Figura 6. Análisis Western Blot. Carril 1, marcador peso molecular (SDS-7B):  $\alpha$ -macroglobulina (180 kDa);  $\beta$ -galactosidasa (116 kDa); fructosa-6 fosfatasa quinasa (84 kDa); piruvato quinasa (58 kDa); Carril 2, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1; Lane 3, cepa LM-011; Carril 4, cepa LM-012; Carril 5, cepa LM-14; Carril 6, cepa LM-033 y Carril 7, cepa *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Control negativo).

Figure 6. Western blot analysis. Lane 1, molecular weight markers (SDS-7B):  $\alpha$ -macroglobulin (180 kDa);  $\beta$ -galactosidase (116 kDa); fructose-6-phosphate kinase (84 kDa); pyruvate kinase (58 kDa); Lane 2, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 used as a positive control; Lane 3, strain LM-011; Lane 4, strain LM-012; Lane 5, strain LM-14; Lane 6, strain LM-033 and Lane 7, strain *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (Negative control).





**Figura 7. Actividad insecticida de las cepas en estudio sobre larvas de primer estadio de *Tuta absoluta* medida a las 144 h.**

**Figure 7. Insecticidal activity of the strains in study on the first instar *Tuta absoluta* measured at 144 h.**

debido a que todas las mediciones presentaron fluctuaciones. Este resultado podría ser explicado por la forma en que la larva se alimenta, la cual es básicamente del mesófilo y también por el hecho que la solución asperjada no es translaminar. Por lo tanto, el único momento en que la larva puede ingerir la protoxina es cuando rompe la epidermis de la hoja, ya sea para ingresar o salir del mesófilo. Debido al método de inmersión y a la anatomía de las hojas es probable que no se hubiese obtenido una distribución homogénea de la protoxina sobre la superficie de la hoja. Por lo tanto, si la larva ingresa a la hoja por un sector en donde no haya quedado protoxina, ésta no será ingerida, lo que traerá como consecuencia la sobrevivencia de la larva. Por tal motivo, es probable que este método no sea el más adecuado para el análisis del grado de toxicidad de las cepas en estudio, pero sí permite entregar un indicio del comportamiento a nivel de campo. No obstante, es posible diferenciar aquellas cepas que presentaron claramente una mejor respuesta relativa a la cepa control Dipel (*kurstaki*). De acuerdo a estos antecedentes, sería aconsejable recurrir al empleo de plantas transgénicas que expresen el gen de la toxina en aquel tejido donde se alimenta esta plaga, con lo cual se lograría un mejor control.

La Figura 8 muestra el efecto de la toxina en función del tiempo. Este resultado se explica por la forma de actuar de la toxina, debido a que ésta debe ser ingerida para desencadenar todo el proceso infeccioso. La muerte no se produce en forma inmediata, sino que pasan varias horas o días para observar los primeros síntomas.

Ferré y Van Rie (2002) afirman haber encontrado los primeros indicios de resistencia a Dipel (*Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*), observando una disminución de 100 veces en la susceptibilidad del insecto (*Plodia interpunctella*). Estos autores afirman que al cambiar la cepa de Bt por una con un contenido génico diferente a la familia *cryIA*, el insecto volvía a ser susceptible. El ensayo biológico demostró que al emplear toxinas de una cepa que contenía el gen *cryICa*, se obtuvo una susceptibilidad 800 veces superior. Por otra parte, Vásquez *et al.* (1995) evaluaron la mortalidad de *T. absoluta* producida por Bt var. *kurstaki* con dosis similares a las ensayadas en el presente trabajo, obteniendo valores de mortalidad superiores a los encontrados en esta investigación.

La  $CL_{(50)}$  y el  $TL_{(50)}$  no fueron obtenidos para cada cepa, debido a las fluctuaciones que presentó la mortalidad en las distintas dosis analizadas. Lo anterior implicó no encontrar la regresión lineal necesaria para la interpolación de dichos valores, pero sí permitieron diferenciar estos porcentajes de mortalidad obtenidos estadísticamente (Cuadro 1).

De las cepas estudiadas, las que ofrecen mayores potencialidades serían las cepas LM-11, LM-012 y LM-033, pues con éstas se logró sobre un 50% de mortalidad con la dosis más baja.

Las larvas afectadas por la toxina mostraron los síntomas descritos por Lamborot y Araya (1986). En las larvas se percibió una disminución del apetito hasta dejar de alimentarse, permaneciendo

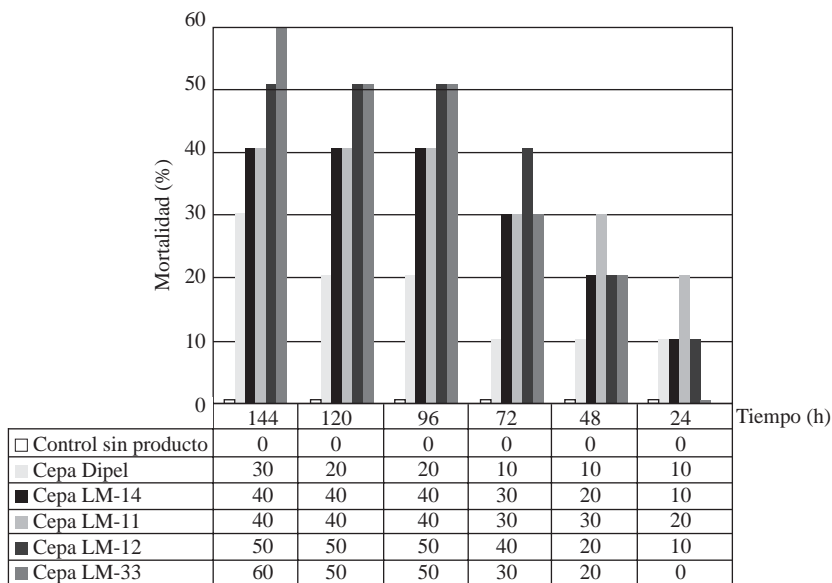


Figura 8. Actividad insecticida media de las cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de primer estadio de *Tuta absoluta* en función del tiempo. Cada tiempo corresponde al promedio obtenido entre todas las observaciones sin considerar la dosis.

Figure 8. Mean insecticide activity of *Bacillus thuringiensis* strains on first instar of *Tuta absoluta* larvae over as a function of time. Each time corresponds to the average obtained among all the observations without considering the dose.

**Cuadro 1. Análisis estadístico de las cepas evaluadas en función al porcentaje de mortalidad.**

**Table 1. Statistical analysis of the strains evaluated in function to percentage of mortality.**

Cepa	Mortalidad (%)
LM-11	44 ab
LM-12	50 ab
LM-14	40 a
LM-33	56 b
Dipel (control comercial)	26 c
Control (sin <i>Bacillus thuringiensis</i> )	0 d

Letras iguales indican ausencia de diferencias significativas, según prueba de Z para proporciones ( $p > 0,05$ ).

inactivas e inmóviles. La inactividad continuó con descargas líquidas orales y anales, y finalmente, la muerte del insecto. Además, en un porcentaje pequeño (2%) se observaron efectos teratogénicos a nivel de pupa. Se advirtió la presencia de adultos incapaces de salir de la envoltura pupal y extender sus alas (Figura 9). Un daño similar fue observado por Liu *et al.* (2001), quienes informaron además, el efecto de la toxina Cry1Ac sobre el peso de la pupa del lepidóptero *Pectinophora gossypiella*. Los autores señalan que con 0,1 µg de toxina por gramo de dieta, se redujo el peso de la pupa desde 23 a 9,9 mg.

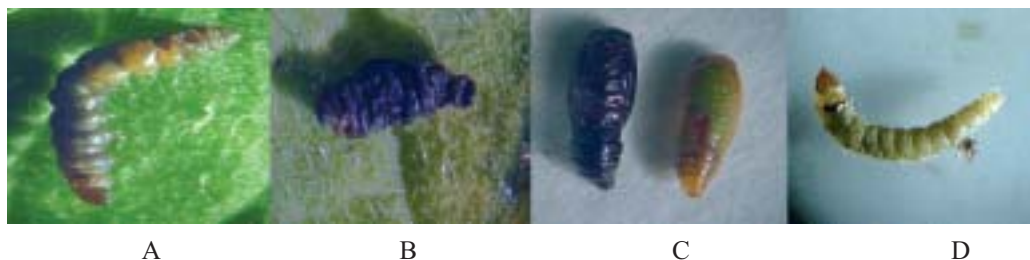


Figura 9. Apariencia de larvas y pupas de *Tuta absoluta*. (A, B, C: después de ingerir *Bacillus thuringiensis* y D: larva no tratada)

Figure 9. Appearance of larvae and pupae of *Tuta absoluta* (A, B, C: after ingesting *Bacillus thuringiensis* and D, untreated larvae)

## CONCLUSIONES

Para la familia génica *cryIA*, desde el punto de vista molecular y serológico, es posible concluir la existencia de una correlación entre el contenido génico y la naturaleza de las proteínas sintetizadas.

La presencia de un determinado gen *cry* en las cepas evaluadas no siempre está asociada a su transcripción y traducción en su correspondiente proteína.

Todas las cepas estudiadas demostraron ser más efectivas que el control sin Bt y el control positivo Dipel (Producto comercial, *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*).

Los bioensayos permiten concluir que bajo estas condiciones, todas las cepas evaluadas sintetizan proteínas con actividad insecticida sobre la larva de la polilla del tomate *Tuta absoluta*.

## RECONOCIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo financiero del Centro de Investigación en Biotecnología Silvoagrícola, Programa CONICYT/Regiones y al Programa de Investigación en Biotecnología Vegetal, Universidad de Talca.

## LITERATURA CITADA

- Abbott, W.S. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18:265-267.
- Aronson, A., and Y. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* toxins are so effective: unique features of their mode of action. *FEMS Microbiol. Lett.* 195:1-8.
- Ceron, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda *et al.* 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60:353-356.
- Ceron, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca, and A. Bravo. 1995. Specific PCR primers direct to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:3826-3831.
- Crickmore, N., E. Bone, J. Williams, and D. Ellar 1995. Contribution of the individual components of the  $\delta$ -endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 131:249-254.
- Crickmore, N., D. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, and D. Dean, 1998. Revisión of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. *Microbiol. and Molecul. Biology Reviews* 62:807-813.
- Feitelson, JS. 1993. The *Bacillus thuringiensis* family tree. p. 63-71. In Kim L. (ed.) *Advanced engineered pesticides*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.
- Ferré, J., and J. Van Rie. 2002. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 47:501-533.
- García, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Univ. Diag.* 1(2):31-41.
- Gill, S., E. Cowles, and P. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37:615-36.
- Giustolin, T., J. Vendramin, S. Alves, A. Viera, and R. Pereira. 2001. Susceptibility of *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lep., Gelechiidae) reared on two species of *Lycopersicon* to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *J. Appl. Entomol.* 125:551-556.
- Höfte, H. and R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Jonhson, D., W. McGaughey, and B. Barnett. 1991. Small scale bioassay for the determination of *Bacillus thuringiensis* toxicity toward *Plodia interpunctella*. *J. Invertebr. Pathol.* 57:159-165.
- Kwang-Bo, J., and J. Côté. 2002. A review of the environmental impacts of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Agriculture and Agri-Food Canada*. Available at <http://www.res2.agrca7stjean/publication7bulk7in7bacillus> Accessed 8 October 2003.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambrot, L., and J. Araya. 1986. Antecedentes sobre *Bacillus thuringiensis*, una bacteria selectiva para controlar insectos. *Acta Entomol. Chil.* 13:183-189.
- Larraín, P. 1986. Plagas del tomate. *Investigación y Progreso Agropecuario* N° 39 p. 30-35.

- Liu, Y., B. Tabashnik, T. Dennehy, A. Patin, M. Sims, S. Meyer, and Y. Carriere. 2001. Effects of Bt cotton and Cry1Ac toxin on survival and development of pink bollworm (Lepidoptera: Gelechiidae). *J. Econ. Entomol.* 94:1237-1242.
- Maagd, R., A. Bravo, and N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxin to colonize the insect world. *Rev. Trend. Genet.* 17:193-199.
- Meza-Basso, L., P. Espinoza, C. Theoduloz, M. Vásquez, C. Parra, J. Zúñiga *et al.* 1993. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*: Una nueva fuente de biopesticidas y su proyección biotecnológica. *Simiente* 2:71-81.
- Moermans, R., and P. Hecke. 1995. Effect of sample size and number of doses for the determination of LD50. *J. Appl. Entomol.* 119:637-642.
- Mullis, K., and F. Faloona. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-350.
- NCSS. 1997. NCSS Statistical Program, System for Windows. Published by NCSS, Kaysville, Utah, USA.
- ODEPA. 2005. Estadísticas macrosectoriales y productivas. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/> Leído el 26 de septiembre de 2005.
- Park, H., B. Ge, L. Bauer, and B. Federici. 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.
- Salazar, E., y J. Araya. 1997. Detección de resistencia a insecticidas en la polilla del tomate. *Simiente* 67:8-22.
- SPSS. Inc. 1996. SPSS. Base 7.0 for Windows computer program manual. 560 p. Statsoft Inc., Tulsa, Oklahoma, USA.
- Theoduloz C., A. Vega, M. Salazar, E. González, and L. Meza-Basso. 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin *cry1Ab* gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Appl. Microbiol.* 94:1-7.
- Tsang, V., J. Peralta, and A. Simons. 1983. Enzyme-linked immunoelectrotransfer beat techniques (EITB) for studying the specificities of antigens and antibodies separated by gel electrophoresis. *Methods Enzymol.* 92:377-391.
- Vásquez, M., C. Parra, E. Hubert, P. Espinoza, C. Theoduloz, and L. Meza-Basso. 1995. Specificity and insecticidal activity of Chilean strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* 66:143-146.
- Yamamoto, T., and G. Powell. 1993. *Bacillus thuriengiensis* crystal proteins: Recents advances in understanding its insecticidal activity. p. 3-42. *In* Kim, L. (ed.). *Advances in engineered pesticides*. Marcel Dekker Inc., New York, USA.