

Estudio de la actividad biológica de 5 proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* en una población española de *Spodoptera exigua* (Hübner)

P. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, B. ESCRICHE

La actividad tóxica de 5 proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis* se analizó en una población española de *Spodoptera exigua*. Los ensayos se realizaron aplicando las proteínas Cry en la superficie de la dieta artificial, empleando 2 concentraciones diferentes para cada una de ellas. Los datos de mortalidad obtenidos para cada proteína se compararon con los valores publicados en la literatura. Las proteínas Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Fa fueron las más tóxicas, mientras que las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac fueron sólo parcialmente tóxicas. Por lo tanto, es importante el empleo de formulaciones que contengan las proteínas más tóxicas para el control eficaz de esta plaga.

P. HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, B. ESCRICHE. Departament de Genètica, Universitat de València, 46100 Burjassot (Valencia), España.

Palabras clave: gardama verde, rosquilla verde, control biológico, delta-endotoxina, toxicidad.

INTRODUCCIÓN

Spodoptera exigua (Hübner, 1808) es un insecto polífago y de hábitos gregarios que ataca a diversos cultivos herbáceos. En zonas del sur de España se presenta con alta incidencia, causando pérdidas económicas importantes en cultivos de invernadero (tomate, judía verde, pimiento) y en cultivos extensivos como el algodón (BELDA *et al.*, 1994; GUIMARAES *et al.*, 1995; SMAGGHE *et al.*, 2000). El uso de insecticidas químicos ha provocado la aparición de resistencia en algunas especies de insectos plaga, además de un fuerte impacto medio ambiental (TORRES-VILA *et al.*, 1998). El uso de insecticidas biológicos como los formulados de *Bacillus thuringiensis* (Bt) son una alternativa a los insecticidas químicos y, actualmente, representan más del 90% de los bioinsecticidas comercializados. La información que

existe sobre los preparados de Bt es, en muchos casos, limitada y son considerados como distintas formulaciones de un mismo principio activo, del cual se proporciona el porcentaje en la etiqueta. La realidad es más compleja pues la toxicidad y especificidad de una cepa concreta de *B. thuringiensis* se debe a los tipos de proteínas Cry que produzca y en qué proporciones estén presentes. Cada cepa de *B. thuringiensis* produce generalmente más de una proteína Cry, de tal forma que se puede considerar que la materia activa de un formulado Bt consiste en una mezcla de derivados de un principio activo, de tal forma que cada cepa se puede considerar un material con especificidades únicas (CERÓN, 2001).

En este trabajo se estudia la susceptibilidad a 5 proteínas Cry de *B. thuringiensis* de una población española de *S. exigua* (ALM), estimando qué proteínas son las más activas

y comparando los datos obtenidos para esta población con otros anteriormente publicados para otras poblaciones de *S. exigua*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Insectos

El ensayo se realizó con una colonia de laboratorio de *S. exigua* (ALM), la cual fue proporcionada por A. Torres, Universidad de Almería, (Almería, España). Se recogió en campos Almería y se mantuvo en el laboratorio durante al menos dos años sin estar expuesta a proteínas Cry de *B. thuringiensis* o a cualquier otro insecticida. La colonia se mantuvo con dieta artificial (MOAR *et al.*, 1995) y en condiciones de laboratorio: $25 \pm 3^\circ\text{C}$, $70 \pm 5\%$ de humedad relativa y un fotoperiodo 16/8 h (luz/oscuridad).

Proteínas Cry

Las proteínas Cry1Ac, Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Fa se obtuvieron a partir de cepas recombinantes de *B. thuringiensis* EG11070, EG1081, EG7300, EG11069, respectivamente (Ecogen Inc., Langhorne, PA). La purificación del cristal proteico, solubilización, activación de la protoxina con tripsina y la cuantificación del fragmento activo se realizó como describió ESTELA *et al.* (2004). Cry1Ab se obtuvo a partir de una cepa recombinante de *Escherichia coli* GG094-208 (cedida por R. A. de Maagd). La purificación de los cuerpos de inclusión, solubilización, activación con tripsina y la cuantificación se llevó a cabo como describió SAYYED *et al.* (2005).

El tamaño y la pureza de los fragmentos activos obtenidos tras la activación de cada proteína se analizó mediante geles de poliacrilamida (12% SDS-PAGE). Las proteínas activas se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

Bioensayos

La susceptibilidad a 5 proteínas Cry se analizó empleando larvas de dos días de edad (48 ± 3 h). Para cada proteína Cry se emplearon 2 concentraciones diferentes en

Cuadro 1. **Proteínas Cry de *B. thuringiensis* y concentraciones empleadas en el ensayo de actividad en larvas de la colonia ALM de *S. exigua*.**

Proteína Cry	Concentración (ng/cm ²)	
	C1	C2
Cry1Ab	46	3750
Cry1Ac	1250	2500
Cry1Ca	16	250
Cry1Da	0,7	180
Cry1Fa	15	1250

cada ensayo (Cuadro 1). Estas concentraciones se determinaron a partir de resultados obtenidos en un estudio realizado previamente por HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.* (2008). Los ensayos se realizaron empleando la técnica de contaminación en superficie en placas de cultivo celular de 24 pocillos de 2 cm² (FERRÉ *et al.*, 1991). Un volumen de 50 μl por pocillo se añadió sobre la dieta en cada pocillo y a continuación las placas se dejaron secar en una campana de flujo laminar al menos durante 2 horas. Una vez seca la superficie se transfirió una larva por pocillo. Los ensayos se repitieron 3 veces para cada proteína Cry y por cada concentración se emplearon 48 larvas. Los controles de cada repetición se realizaron con agua destilada. Las placas del bioensayo se mantuvieron en cámaras de crecimiento de insectos con una temperatura de $25 \pm 3^\circ\text{C}$, una humedad relativa del $70 \pm 5\%$ y un fotoperiodo de 16-8 h (luz/oscuridad). Los datos de mortalidad se obtuvieron a los 5 días. Las orugas se consideraron muertas si no eran capaces de moverse cuando se les tocaba suavemente con la punta de un pincel.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La mortalidad observada en los ensayos de susceptibilidad en *S. exigua* mostró una relación directa con la concentración empleada para las diferentes proteínas Cry activadas de *B. thuringiensis* (Cuadro 2). Los controles, en los cuales no se expusieron las larvas a las proteínas Cry, mostraron una mortalidad media de un 7%.

Cuadro 2. Mortalidad corregida de las larvas de *S. exigua* expuestas a proteínas Cry empleando dos concentraciones (C1 y C2) descritas en el Cuadro 1 para cada una de ellas.

Proteína Cry	Concentración	N ¹	% Mortalidad \pm SD
Cry1Ab	C1	144	14 \pm 1,2
	C2	144	36 \pm 5,4
Cry1Ac	C1	144	32 \pm 2,1
	C2	144	42 \pm 1,7
Cry1Ca	C1	144	22 \pm 2,5
	C2	144	49 \pm 1,1
Cry1Da	C1	144	40 \pm 0,8
	C2	144	70 \pm 0,8
Cry1Fa	C1	144	41 \pm 1,4
	C2	144	55 \pm 2,1

¹N: Número total de larvas

El porcentaje de mortalidad obtenido para cada proteína y concentración se muestra en el Cuadro 2. La concentración menor escogida (C1) para cada proteína causó de un 14% a un 41% de mortalidad, mientras que la concentración mayor (C2) causó de un 36% a un 70% de mortalidad. Las mortalidades observadas para la concentración inferior (C1) se ajustan a las esperadas (aproximadamente un 25 %), basándonos en los datos previos publicados (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2008), sin embargo la población ALM resultó, en general, menos susceptible para las concentraciones mayores (C2), en las que se esperaba un 75% de mortalidad.

Las proteínas con mayor actividad insecticida contra la colonia ALM de *S. exigua* (Cuadro 2 y Figura 1) fueron Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Fa, mientras que las proteínas Cry1Ab y Cry1Ac poseen una actividad insecticida mínima contra *S. exigua*.

La susceptibilidad en diferentes colonias de laboratorio de *S. exigua* frente a diferentes proteínas Cry de *B. thuringiensis* ha sido estudiada en numerosos artículos (HONEE *et al.*, 1990; MACINTOSH *et al.*, 1990; MOAR *et al.*, 1990; VISSER *et al.*, 1990; CHAMBERS *et al.*, 1991; MOAR *et al.*, 1995; DE MAAGD *et al.*, 1996; LUO *et al.*, 1998; ABDUL-RAUF and ELLAR, 1999; DE MAAGD *et al.*, 2000; HERRERO *et al.*, 2001; GILLIAND *et al.*, 2002). Sin embargo, la información obtenida en los

estudios realizados es fragmentada, ya que la mayoría de ellos sólo estudian la susceptibilidad para un número reducido de estas proteínas Cry (de 2 a 4 proteínas). Esto dificulta que los resultados puedan ser fácilmente comparados, ya que la variabilidad puede deberse a variaciones en la metodología (método de bioensayo empleado, fuente y obtención de las proteínas Cry, entre otros), pero también a la variación de susceptibilidad intraespecífica (empleo de diferentes poblaciones de *S. exigua*). Pese a todas estas variaciones, que pueden estar influyendo en los resultados cuantitativos finales, analizando cualitativamente los valores del presente estudio junto con los descritos en la bibliografía se puede concluir que las proteínas Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Fa son activas contra *S. exigua*, mientras que Cry1Ab y Cry1Ac son poco activas. No obstante, esto no implica que las proteínas activas sean igual de efectivas entre ellas, y adicionalmente, se observan algunas variaciones de efectividad entre las poblaciones. Así, en un estudio que se realizó en paralelo para dos poblaciones de laboratorio de *S. exigua* (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2008) se observó que el patrón de toxicidad era similar, pero se encontraron diferencias significativas a nivel de valor de CL₅₀ para las proteínas Cry1Ab y Cry1Da.

La mayor parte de estudios se han realizado empleando poblaciones mantenidas

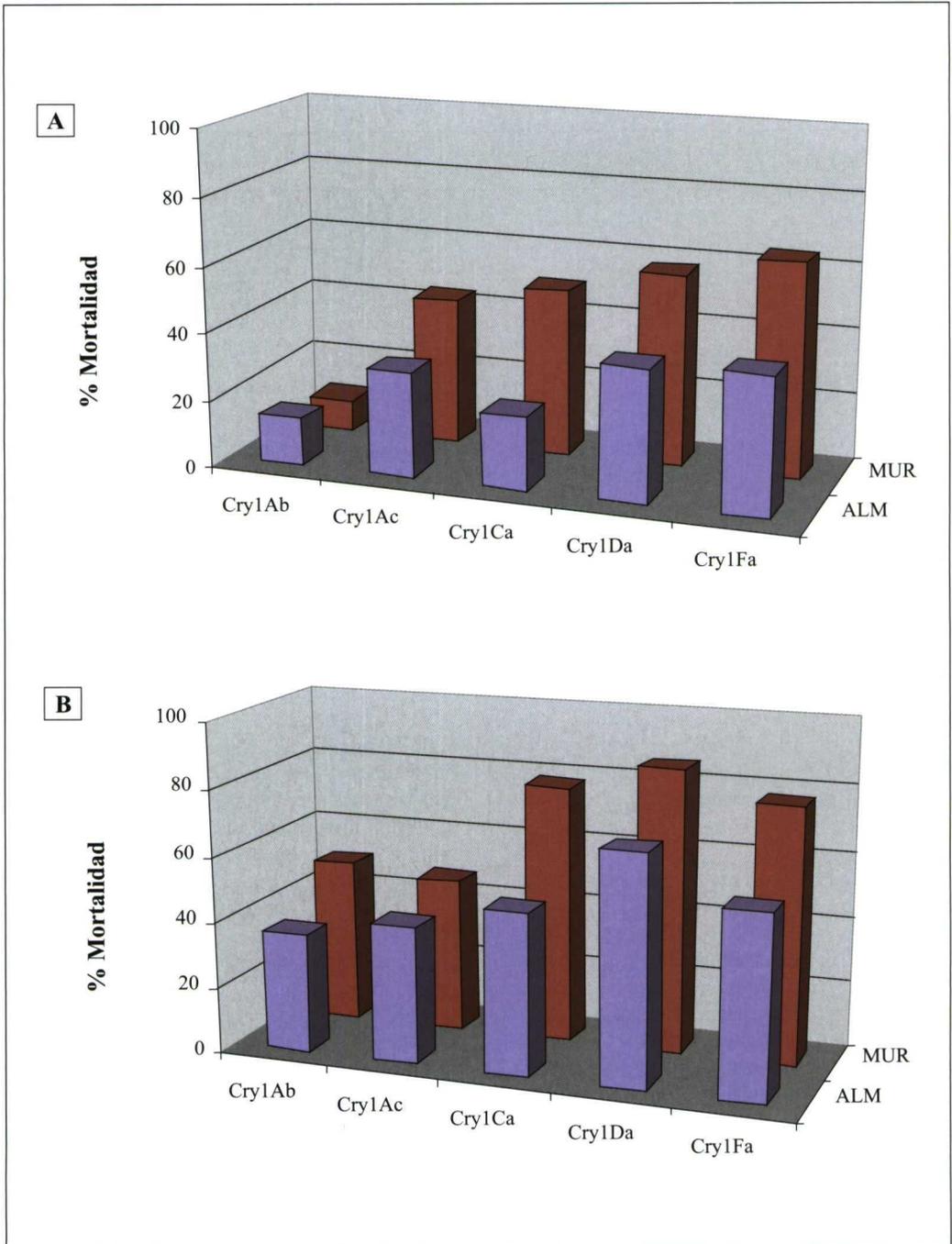


Figura 1. Patrón de susceptibilidad, para 5 proteínas Cry, observado para dos colonias de procedencia española ALM y MUR. Los paneles A y B muestran los porcentajes de mortalidad obtenidos para las concentraciones C1 y C2, respectivamente (descritas en el Cuadro 1).

largos periodos de tiempo en el laboratorio. Estas poblaciones pueden ser sólo parcialmente representativas de la susceptibilidad y variabilidad de las poblaciones de campo. El primer trabajo que incluyó un estudio de variación de la susceptibilidad empleando proteínas Cry de *B. thuringiensis* entre diferentes poblaciones de campo de *S. exigua*, fue descrito por LUTTRELL *et al.* (1999). En este trabajo se describen diferencias en el valor de CL_{50} de unas 17 veces para la proteína Cry1Ac. En un trabajo posterior (HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ *et al.*, 2008) se estudió la susceptibilidad frente a 9 proteínas Cry de *B. thuringiensis* comparando 3 colonias de *S. exigua*: 2 de laboratorio y una colonia autóctona española (MUR). Este último trabajo se realizó en paralelo al expuesto en el presente trabajo con la colonia ALM. El patrón de susceptibilidad para las 2 colonias españolas (MUR y ALM) fue similar tanto empleando altas como a bajas concentraciones de proteínas Cry (Figura 1), y resulta muy similar al obtenido con otras colonias de laboratorio, aunque parece observarse una menor susceptibilidad para la colonia ALM frente a las 5 proteínas Cry analizadas. La similitud de susceptibilidad a proteínas Cry entre poblaciones de campo o de laboratorio de un mismo insecto ha sido descrita anteriormente para especies como, *Heliothis virescens* (Fabricius, 1977), *Helicoverpa zea* (Boddie, 1850) y *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (LUTTRELL *et al.*, 1999), y sigue siendo básicamente asumida en la mayor parte de los casos. Sin embargo según los datos aquí presentados para *S. exigua*, y otros publicados para *Trichoplusia ni* (Hübner, 1803) (IRACHETA *et al.*, 2000), *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (GONZÁLEZ-CABRERA *et al.*, 2001) y *S. frugiperda* (MONNERAT *et al.*, 2006) se mues-

tra la existencia de cierta variabilidad intra-específica silvestre, tal y como ocurre con los insecticidas convencionales de síntesis química.

El empleo de productos basados en *B. thuringiensis* resulta esencial para el control integrado de plagas de lepidópteros en España, sobretudo en cultivos de invernadero. Dada la importancia de *S. exigua* y su difícil control, nuestro estudio muestra que se podría conseguir mayor eficacia utilizando preparados que contengan mayoritariamente las proteínas Cry1Ca, Cry1Da y Cry1Fa. El contenido en proteínas Cry del cristal parasporal muestra una cierta relación con el serovar de *B. thuringiensis* al que pertenece (MARTÍNEZ y CABALLERO, 2002). Los productos comercializados en España se basan fundamentalmente en preparados de *B. thuringiensis* serovar *kurstaki*, cuyo contenido fundamental en general son proteínas de la familia Cry1A (MARTÍNEZ y CABALLERO, 2002), las cuales hemos mostrado que son poco efectivas frente a *S. exigua*. Nuestro trabajo sugiere que se debe continuar la investigación para localizar cepas de *B. thuringiensis* que tengan una actividad superior a las actualmente empleadas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a la financiación recibida a través de los proyectos concedidos por la Generalitat Valenciana (GV04B-165 y GVARVIV2007-090), y del Ministerio de Ciencia y Tecnología (AGL2003-09282-C03). Patricia Hernández-Martínez posee una beca predoctoral (BES- 2004- 34469 para su financiación y Baltasar Escriche ha sido financiado por el programa Ramón y Cajal. Agradecemos a Juan Ferré Manzanero por la revisión del manuscrito.

ABSTRACT

HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ P., B. ESCRICHE. 2008. Study of the biological activity of 5 Cry proteins from *Bacillus thuringiensis* against one population of *Spodoptera exigua* (Hübner). *Bol. San. Veg. Plagas*, **34**: 45-51.

The toxic activity of 5 Cry proteins of *Bacillus thuringiensis* was tested against one Spanish colony of *Spodoptera exigua*. The assays were done by adding over the surface of an artificial diet the different Cry proteins, using two different concentrations of each one. The mortality data obtained for each protein were compared with previous mortality data published in the literature. Cry1Da, Cry1Ca and Cry1Fa proteins were the most toxic, while Cry1Ab and Cry1Ac were partially toxic. Therefore, in order to get an effective control against this insect pest it is important to use products which contain the toxic proteins.

Key words: beet armyworm, biological control, delta-endotoxin, toxicity.

REFERENCIAS

- ABDUL-RAUF, M., ELLAR, D. J. 1999. Toxicity and receptor binding properties of a *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin active against both lepidoptera and diptera. *J. Invert. Pathol.*, **73**: 52-58.
- BELDA, J., JUSTICIA, L., PASCUAL, F., CABELLO, T. 1994. Distribución espacial de *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lep.; Noctuidae) en cultivo de pimiento en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas*, **20**: 287-301.
- CERÓN, J. A. 2001. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis*, p.p 153-168. En Caballero, P. y Ferré, J. (eds.), Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el control integrado de plagas. Phytoma-España.
- CHAMBERS, J. A., JELEN, A., GILBERT, M. P., JANY, C. S., JOHNSON, T. B., GAWRON-BURKE, C. 1991. Isolation and characterization of a novel insecticidal of a novel insecticidal crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai*. *J. Bacteriol.*, **90**: 3966-3976.
- DE MAAGD, R., KWA, M. S. G., VAN DER KLEI, H., YAMAMOTO, T., SCHIPPER, B., VLAK, J. M., STIEKEMA, W. J., BOSH, D. 1996. Domain III substitution in *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1Ab results in superior toxicity for *Spodoptera exigua* and altered membrane protein recognition. *Appl. Environ. Microbiol.*, **96**: 1537-1543.
- DE MAAGD, R., KWA, W., WEEMEN-HENDRIKS, M., STIEKEMA, W., BOSCH, D. 2000. *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin Cry1C domain III can function as a specificity determinant for *Spodoptera exigua* in different, but not all, Cry1-Cry1C hybrids. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**: 1559-1563.
- ESTELA, A., ESCRICHE, B., FERRÉ, J. 2004. Interaction of *Bacillus thuringiensis* toxins with larval midgut binding sites of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**: 1378-1384.
- FERRÉ, J., M. REAL, D., VAN RIE, J., JANSSENS, S., PEFFEROEN, 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.
- GILLILAND, A., CHAMBERS, C. E., BONE, E. J., ELLAR, D. J. 2002. Role of *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxin binding in determining potency during lepidopteran larval development. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 1509-1515.
- GONZALEZ-CABRERA, J., HERRERO, S., SAYYED, A. H., ESCRICHE, B., LIU, Y. B., MEYER, S. K., WRIGHT, D. J., TABASHNIK, B. E., FERRE, J., 2001. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 4610-4613.
- GUIMARAES, F. R., VARGAS-OSUNA, E., MARACAJÁ, P. B., SANTIAGO-ALVAREZ, C. 1995. Presencia de *Spodoptera exigua* Hb. (Lep.; Noctuidae) y sus agentes bióticos asociados en la provincia de Córdoba. *Bol. San. Veg. Plagas*, **21**: 641-646.
- HERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, P., FERRÉ, J., ESCRICHE, B. 2008. Susceptibility of *Spodoptera exigua* to 9 toxins from *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* **97**: 245-250.
- HERRERO, S., GÓNZALEZ-CABRERA, J., TABASHNIK, B. E., FERRÉ, J. 2001. Shared binding sites in lepidoptera for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ja and Cry1A toxins. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**: 5729-5734.
- HONEE, G., VRIEZEN, W., VISSER, B. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits an enlarged insecticidal spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.*, **90**: 823-825.
- IRACHETA, M. M., PEREYRA-ALFEREZ, B., GALAN-WONG, L., FERRÉ, J. 2000. Screening for *Bacillus thuringiensis* crystal proteins active against the cabbage looper, *Trichoplusia ni*. *J. Invert. Pathol.*, **76**: 70-75.
- LUO, K., BANKS, D., ADANG, M. J. 1998. Toxicity, binding, permeability analyses of four *Bacillus thuringiensis* Cry1 δ -endotoxins using brush border membrane vesicles of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **99**: 457-464.
- LUTTRELL, R. G., WAN, L., KNIGHTEN, K. 1999. Variation in susceptibility of noctuid (Lepidoptera) larvae attacking cotton and soybean to purified endotoxin

- proteins and commercial formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.*, **92**: 21-32.
- MACINTOSH, S. C., STONE, T. B., SIMNS, S. R., HUNST, P. L., GREENPLATE, J. T., MARRONE, P. G., PERLAK, F. J., FISCHHOFF, D. A., FUCHS, R. L. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invert. Pathol.*, **56**: 258-266.
- MARTÍNEZ, C., CABALLERO, P. 2002. Contents of cry genes and insecticidal toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains from terrestrial and aquatic habitats. *J. Appl. Microbiol.*, **92**: 745-752.
- MOAR, W. J., MASSON, L., BROUSSEAU, R., TRUMBLE, J. T. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *trichoplusia ni* of individual P1 protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. *Appl. Environ. Microbiol.*, **90**: 2480-2483.
- MOAR, W. J., PUSZTAI-CAREY, M., VAN FAASSEN, H., BOSH, D., FRUTIS, R., RANG, C., LUO, K., ADANG, M. J. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* Cry1C resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). *Appl. Environ. Microbiol.*, **95**: 2086-2092.
- MONNERAT, R., MARTINS, E., QUEIROZ, P., ORDUZ, S., JARAMILLO, G., BENINTEDE, G., COZZI, J., REAL, D. M., MARTINEZ-RAMIREZ, A., RAUSELL, C., CERON, J., IBARRA, J. E., DEL RINCON-CASTRO, M. C., ESPINOZA, A. M., MEZA-BASSO, L., CABRERA, E., SANCHEZ, 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.*, **67**: 4610-4613.
- SAYYED, A. H., GATSI, R., IBIZA-PALACIOS, M., ESCRICHE, B., WRIGHT, D. J., CRICKMORE, N. 2005. Common, but complex, mode of resistance of *Plutella xylostella* to *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Ab and Cry1Ac. *Appl. Environ. Microbiol.*, **11**: 6863-6868.
- SMAGGHE, G., MEDINA, S., SCHUYESMANS, S., TIRRY, L., VIÑUELA, E. 2000. Estudios de resistencia a tebufenocida en *Spodoptera exigua* (Hübner [1808]). *Bol. San. Veg. Plagas*, **26**: 475-481.
- TORRES-VILA, L. M., RODRÍGUEZ-MOLINA, M. C., LACASA, A., PALO, E., MEJÍAS TAPIA, M., GUERRERO, M. 1998. Susceptibilidad a 20 insecticidas de *Helicoverpa armigera* Hb. y *Spodoptera exigua* Hb. (Lepidoptera: Noctuidae) en las Vegas del Guadiana (Extremadura). *Bol. San. Veg. Plagas*, **24**: 353-362.
- VISSE, B., MUNSTERMAN, E., STOKER, A., DIRKSE, W. G. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua*-specific crystal protein. *J. Bacteriol.*, **90**: 6783-6788.

(Recepción: 22 noviembre 2007)

(Aceptación: 20 febrero 2008)