

Susceptibilidad de larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) a la delta-endotoxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Berliner)

J. RAMOS GUTIÉRREZ, J. F. ORTIZ, E. VARGAS OSUNA

Se han realizado bioensayos para determinar la susceptibilidad de *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) a la toxina Cry1Ac de *Bacillus thuringiensis* (Berliner). Las pruebas de toxicidad se han realizado incorporando la toxina a una dieta semisintética y ofreciéndola a larvas de primer estadio procedentes de poblaciones autóctonas mantenidas en insectario. Estas poblaciones fueron establecidas a partir de larvas recogidas en cultivos de algodón del Valle del Guadalquivir. Con los datos de mortalidad se determinaron las concentraciones letales medias y los tiempos letales medios de cada especie. La delta-endotoxina Cry1Ac fue tóxica para las larvas de ambas especies. Sin embargo, las larvas de *E. insulana* mostraron mayor susceptibilidad a la toxina que las de *H. armigera*.

J. RAMOS GUTIÉRREZ, J. F. ORTIZ, E. VARGAS OSUNA: Entomología Agroforestal. Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales. E.T.S.I.A.M. Universidad de Córdoba. Apartado 3048. 14080 CÓRDOBA. e.mail: cr1vaose@uco.es.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxina, *Earias insulana*, *Helicoverpa armigera*, toxicidad.

INTRODUCCIÓN

El cultivo del algodón en España se concentra en su mayor parte en Andalucía, concretamente en el Valle del Guadalquivir. Entre los problemas fitosanitarios de este cultivo destacan las pérdidas producidas por tres especies de lepidópteros: los noctuidos *Helicoverpa armigera* (Hübner) y *Earias insulana* (Boisduval) y el gelechiido *Pectinophora gossypiella* (Saunders), denominadas conjuntamente orugas de las cápsulas. Las larvas se introducen en los botones, flores y cápsulas del algodón, ocasionando la caída del órgano fructífero o daños en la fibra. Se estima que más de la mitad de los tratamientos insecticidas aplicados en el cultivo van dirigidos al control de estas especies (ALVARADO y DURÁN, 1996).

Actualmente se siguen usando de forma generalizada insecticidas químicos de síntesis que ocasionan problemas de aparición de resistencias, además de los residuos y contaminación ambiental. Esto hace que sea deseable la introducción de alternativas más respetuosas con el medio ambiente y de acción más selectiva.

Hoy se conocen patógenos de insectos con potencial como agentes de lucha biológica, de los cuales el más desarrollado es *Bacillus thuringiensis* (Berliner) (FRANKENHUYZEN, 1993). El poder insecticida de esta bacteria reside en la formación, durante la fase de esporulación, de cristales proteicos que contienen una o más proteínas (delta-endotoxinas) causantes del efecto letal al ser ingeridas por las larvas. La subespecie *kurstaki* produce la toxina Cry1Ac con efecto selectivo sobre lepidópteros.

Existen diversos preparados comerciales que contienen como materia activa la toxina Cry1Ac para el control de orugas de lepidópteros causantes de daños a plantas cultivadas. Estos insecticidas se caracterizan por ser selectivos y, a diferencia de otros agentes biológicos, tener un efecto de choque similar al de los insecticidas químicos.

Actualmente disponemos de pocos datos sobre la toxicidad de Cry1Ac para larvas de *H. armigera* (CHAKRABARTI *et al.*, 1998) y no se conoce la susceptibilidad de las poblaciones autóctonas del Valle del Guadalquivir que causan importantes daños en el cultivo del algodón. En el caso de *E. insulana* el desconocimiento es casi total.

Debido a la similitud en hábitos alimenticios de ambas especies, la lucha contra ellas suele abordarse de forma conjunta. Así, los tratamientos con insecticidas químicos de amplio espectro realizados contra *H. armigera* mantienen controladas las poblaciones de *E. insulana*. Si se llegan a establecer estrategias de control basadas en el uso de *B. thuringiensis*, como puede ocurrir si se permite finalmente el cultivo de algodón genéticamente modificado que produce Cry1Ac para la protección contra las orugas de las cápsulas (NOVILLO *et al.*, 1999), es de gran importancia conocer las diferencias de susceptibilidad a la delta-endotoxina entre ambas especies para poder asegurar un adecuado control de las mismas.

En este trabajo se compara, mediante ensayos de laboratorio, la susceptibilidad de poblaciones autóctonas de *H. armigera* y *E. insulana* a la delta endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Entre los meses de julio y septiembre se realizaron prospecciones de campo para la recogida de larvas de ambas especies en distintas localidades, principalmente en la provincia de Córdoba y Sevilla. Las larvas se alimentaron con dieta semisintética de maíz

(OBALLE, 1997) y se mantuvieron para su cría en condiciones controladas (24 ± 2 °C y 16 horas luz / 8 h oscuridad).

Bioensayos

Se utilizó un formulado comercial a base de cristales microencapsulados con un 17,9% de la delta-endotoxina Cry1Ac procedente de *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki*.

Ambas especies tienen hábitos endófitos, por lo que seguimos el método de bioensayo descrito por SIMS *et al.* (1996), incorporando a la dieta semisintética la cantidad adecuada de producto. Trozos de dieta cilíndricos de 11 mm de diámetro y 5 mm de altura se depositaron en cajas de plástico de 28 mm de diámetro y 14 mm de altura con cierre hermético. En cada caja se colocó una larva neonata.

Para *H. armigera* se usaron 5 concentraciones de toxina: 5, 10, 20, 50 y 100 µg/ml de dieta y un testigo sin toxina. Se realizaron 4 repeticiones con 40 individuos cada una y las larvas se observaron diariamente para conocer el estado de desarrollo y la mortalidad. En el ensayo con *E. insulana* las concentraciones empleadas fueron 0,25, 0,5, 1, 2,5 y 5 µg de toxina/ml de dieta y un testigo sin toxina. Debido a la baja fertilidad de los adultos de esta población en condiciones de insectario, sólo se pudieron realizar 2 repeticiones de 30 larvas cada una. Ambos ensayos fueron concluidos cuando cesó la mortalidad larvaria.

Las rectas de regresión concentración-mortalidad se determinaron mediante regresión cualitativa Probit, usando el programa POLO (Leora Software Inc. Berkeley, CA, USA) basado en el método de FINNEY (1971). Los tiempos letales medios se calcularon a partir de la fórmula de BIEVER y HOSTETTER (1971) y se sometieron a análisis de la varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Helicoverpa armigera

En el bioensayo de susceptibilidad de las larvas de *H. armigera*, no hubo mortalidad

del testigo mientras que las tratadas murieron en relación directa con la concentración de toxina incorporada a la dieta (Fig. 1). Todas las larvas murieron en el primer estadio.

En el Cuadro 1 se indican los tiempos letales medios para las concentraciones que alcanzaron el 50% de mortalidad larvaria. Los valores se sitúan en torno a 4 días, sin que existan diferencias significativas. Estos tiempos letales medios pueden parecer altos, sin embargo, no están reñidos necesariamente con un control efectivo de la plaga en campo, ya que las larvas dejan de alimentarse y causar daños pocas horas después de ingerir la endotoxina, muriendo finalmente por inanición.

Al observar la distribución por estadios de las larvas supervivientes al bioensayo (Fig. 2) se aprecia una fuerte inhibición del desarrollo de las larvas tratadas con respecto a las del testigo, en relación directa a la

concentración de la toxina. Este efecto se manifiesta desde la concentración más baja, donde aún quedan larvas de primer estadio al finalizar el ensayo. A las dosis más altas, ninguna de las larvas supervivientes había conseguido mudar al segundo estadio. Esta inhibición del desarrollo ha sido observada por otros autores (SIMS *et al.*, 1996) y se debe probablemente a los graves daños que la endotoxina causa en el tejido del mesenterón que impiden la correcta asimilación y retención de los compuestos necesarios para el desarrollo de la larva (ESCRICHE y FERRÉ, 2001). Mientras estas larvas supervivientes estén ingiriendo la toxina, la inhibición se mantiene hasta llegar a producir la muerte mucho tiempo después del tratamiento (datos no publicados), lo que daría lugar en campo a una mayor predisposición de estas larvas a sus enemigos naturales (parasitoides y depredadores). Si bien no

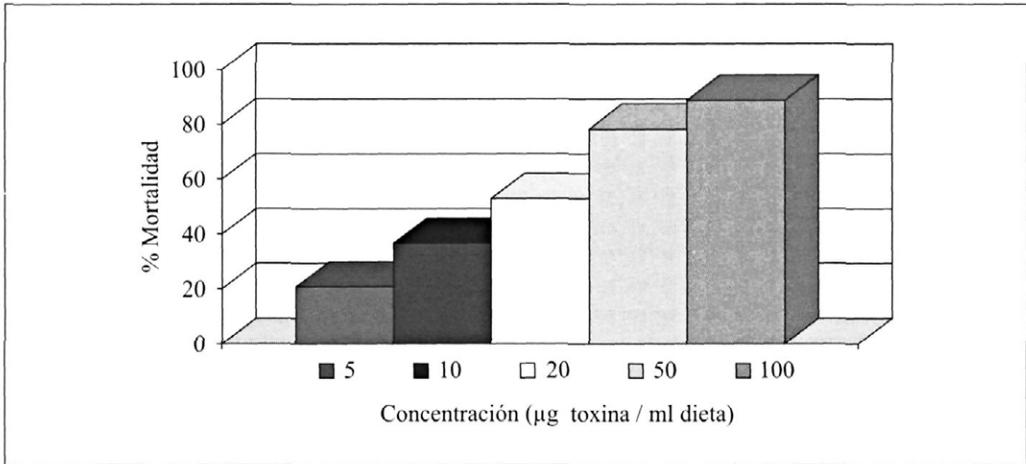


Figura 1: Mortalidad de larvas de *Helicoverpa armigera* tratadas con Cry1Ac

Cuadro 1.-Tiempos letales medios de larvas de *Helicoverpa armigera* tratadas en primer estadio con Cry1Ac

Dosis µgr/ml dieta	% Mortalidad	TL 50 (días)	
		Media	σ
50	78,21	4,27	1,94
100	88,68	3,99	1,88

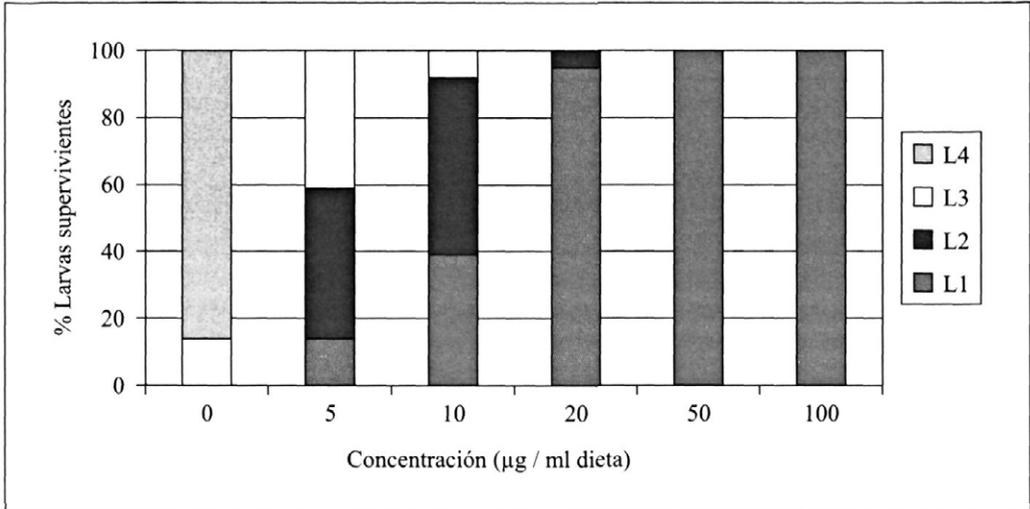


Figura 2: Distribución por estadios de las larvas de *Helicoverpa armigera* supervivientes a los tratamientos con CryIAC

existen datos al respecto, es muy probable que al menos algunas de las larvas puedan recuperarse y proseguir su normal desarrollo si dejan de ingerir toxina, si bien puedan manifestar posteriormente efectos a largo plazo derivados de la ingestión de dosis subletales.

Earias insulana

En el bioensayo de susceptibilidad de larvas de *E. insulana* se observó también una relación directa entre mortalidad y la concentración de toxina en la dieta (Fig. 3). No hubo muertes entre las larvas del testigo y

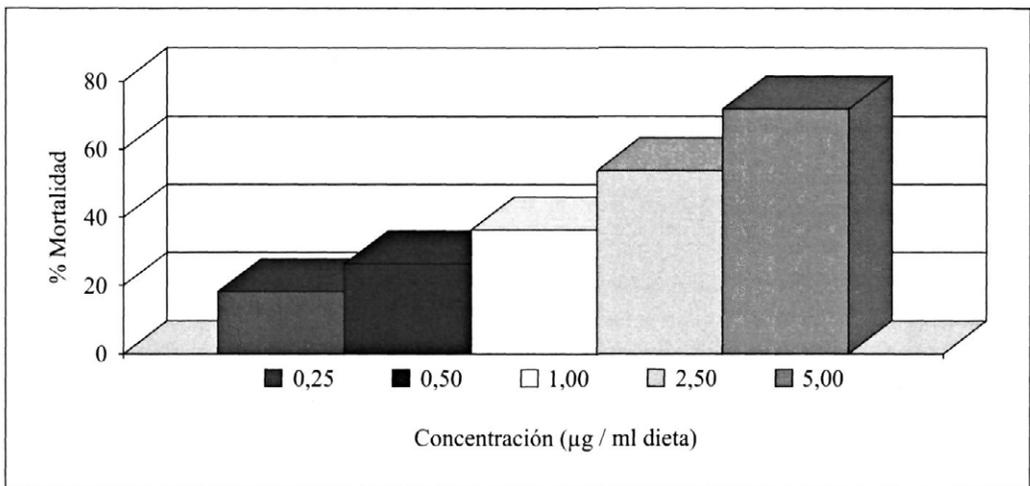


Figura 3: Mortalidad de larvas de *Earias insulana* tratadas con CryIAC

casi todas las larvas tratadas murieron en el primer estadio, tan sólo 4 de 113 murieron en el segundo estadio.

Los tiempos letales medios se sitúan en torno a 6 días, sin que haya ningún efecto significativo de la concentración de toxina (Cuadro 2).

También en este caso se observó una inhibición del desarrollo en relación directa con la concentración de toxina. Este efecto, aunque perfectamente apreciable, no fue tan intenso como en el caso de *H. armigera*, ya que a las concentraciones más altas la mayoría de las larvas supervivientes consiguieron llegar al segundo estadio (Fig. 4).

Relación Concentración-Mortalidad

Con los datos de mortalidad larvaria se estimaron las rectas de regresión Probit que

reflejan la respuesta de cada una de las especies a la toxina. Ambas rectas se ajustaron bien a los datos, tal como lo indica el test χ^2 .

En base a las Concentraciones letales medias (CL₅₀) obtenidas a partir de las rectas de regresión (Cuadro 3), *E. insulana* (CL₅₀ = 1,83 µg/ml) es del orden de 9 veces más susceptible a Cry1Ac que *H. armigera* (CL₅₀ = 16,81 µg/ml). Las pendientes de las rectas difieren significativamente entre sí, poniendo de manifiesto una distinta respuesta de cada especie al incremento de concentración de toxina.

La CL₅₀ para *H. armigera* es mucho menor que la encontrada por otros autores. Así por ejemplo CHAKRABARTI *et al.*, (1998) citan valores en torno a 0,002 µg/ml para poblaciones de *H. armigera*. Estos autores, sin embargo, no emplean un producto comercial, sino la toxina Cry1Ac purificada y activada, si bien esto no parece explicar sufi-

Cuadro 2.—Tiempos letales medios de larvas de *Earias insulana* tratadas en primer estadio con Cry1Ac

Dosis µgr/ml dieta	% Mortalidad	TL 50 (días)	
		Media	σ
2,5	53,57	6,00	0
5	71,70	5,98	1,91

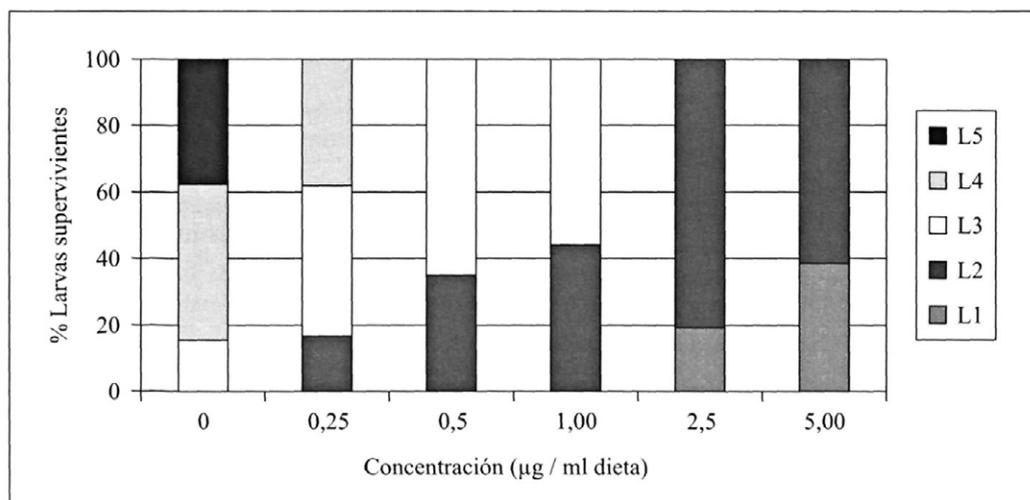


Figura 4.—Distribución por estadios de las larvas de *Earias insulana* supervivientes a los tratamientos con Cry1Ac

Cuadro 3.-Rectas de regresión Probit de la actividad de la toxina Cry1Ac en larvas de primer estadio de *Helicoverpa armigera* y *Earias insulana*

Especie	χ^2 (3 g.l.)	Recta de regresión	Error Pendiente	CL ₅₀ (μ gr/ml)	Límites de confianza	
					Inferior	Superior
<i>H. armigera</i>	0,3633	$y = 1,57x + 3,08$	0,1129	16,81	14,50	19,36
<i>E. insulana</i>	0,5453	$y = 1,12x + 4,71$	0,1776	1,83	1,32	2,78

cientemente la diferencia con nuestros resultados. Estas discrepancias nos sugieren, más bien, que las poblaciones de *H. armigera* del Valle del Guadalquivir son menos susceptibles a esta endotoxina.

Habitualmente, los agricultores de la zona no realizan tratamientos específicos contra *E. insulana* ya que esta especie es sensible a los tratamientos con insecticidas químicos de síntesis empleados en la lucha contra *H. armigera*. Esta misma situación podría mantenerse en el caso de la aplicación de tratamientos basados en la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis*, ya que, de acuerdo a nuestros datos, *E. insulana* es más susceptible a esta endotoxina que *H. armigera*.

CONCLUSIONES

- La endotoxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* incorporada a la dieta semisintética

fue tóxica tanto para las larvas de primer estadio de *H. armigera* como para las de *E. insulana*.

- Las larvas de *H. armigera* murieron a partir del primer día de tratamiento sin lograr alcanzar el segundo estadio, con tiempos letales medios en torno a 4 días, mientras que las larvas de *E. insulana* murieron en el primer o segundo estadio, con tiempos letales medios de 6 días aproximadamente.

- Las larvas de ambas especies que sobrevivieron al tratamiento con la delta-endotoxina presentaban inhibición del desarrollo en relación directa con la concentración de la toxina.

- Las larvas de *E. insulana* mostraron una mayor susceptibilidad a la toxina Cry1Ac que las de *H. armigera*. Por lo tanto, el uso de este producto podría proteger al algodón frente a ambas especies fitófagas.

ABSTRACT

RAMOS GUTIÉRREZ J., J. F. ORTIZ, E. VARGAS OSUNA. 2004. Susceptibility of first instar *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* (Berliner) Cry1Ac toxin. *Bol. San. Veg. Plagas*, **30**: 239-245

Bioassays have been conducted to determine the susceptibility of first instar *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Earias insulana* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae to *Bacillus thuringiensis* (Berliner) Cry1Ac toxin. Toxicity tests were done by adding the toxin to a semisynthetic diet and offering it to individuals reared in laboratory. These populations were established from larvae collected in cotton crops of the Guadalquivir Valley. Median lethal concentrations and median lethal times for each species were estimated. The Cry1Ac delta-endotoxin added to semisynthetic diet was toxic to both species, nevertheless, *E. insulana* larvae showed more susceptibility to toxin than those of *H. armigera*.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxin, *Earias insulana*, *Helicoverpa armigera*, toxicity.

REFERENCIAS

- ALVARADO, M. y DURÁN, J.M., 1996: Incidencias climáticas y fitosanitarias en los cultivos españoles durante 1995: Algodón. *Phytoma España*, **77**: 18-23.
- BIEVER, K.D. y HOSTETTER, D.L., 1971: Activity of the nuclear polyhedrosis virus of the cabbage looper evaluated at programme temperature regimens. *J. Invertebr. Pathol.*, **18**: 81-84.
- CHAKRABARTI, S.K.; MANDAOKAR, A.; ANANDA KUMAR, P. y SHARMA, R.P., 1998: Efficacy of lepidopteran specific-endotoxins of *Bacillus thuringiensis* against *Helicoverpa armigera*. *J. Invertebr. Pathol.*, **72**: 336-337.
- ESCRICHE, B. y FERRÉ, J., 2001: Modo de acción de las proteínas insecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bioinsecticidas: fundamentos y aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas (CABALLERO, P. y FERRÉ, J. Eds.). *Phytoma-España*.
- FRANKENHUYZEN, K. VAN 1993: The challenge of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide (ENTWISTLE, P.F.; CORY, J.S.; BAILEY, M.J. y HIGGS, S., Eds.). John Wiley & Sons. New York.
- FINNEY, D. J., 1971: *Probit analysis*. Cambridge Univ. Press. 333 pp.
- NOVILLO, C.; SOTO, J. y COSTA, J., 1999. Resultados en España con variedades de algodón, protegidas genéticamente contra las orugas de las cápsulas. *Bol. San. Veg. Plagas*, **25**: 383-393.
- OBALLE, R., 1997: *Selección de agentes bióticos autóctonos para el control biológico de las plagas de Helicoverpa armigera* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis doctoral, Universidad de Córdoba. 204 pp.
- SIMS, S.R.; GREENPLATE, J.T.; STONE, T.B.; CAPRIO, M.A. y GOULD, F.L., 1996: Monitoring strategies for early detection of Lepidoptera resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal proteins, pp. 229-242. En T. M. BROWN, (ed.), *Molecular Genetics and Ecology of Pesticide Resistance*. American Chemical Society Symposium Series.

(Recepción: 26 junio 2003)

(Aceptación: 15 julio 2003)