

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO

"Caracterización molecular de una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis*
e implementación de un sistema novedoso de bioensayo para evaluar su efecto tóxico
contra la plaga del arroz, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae)"

Tesis sometida a consideración de la Comisión del Programa de Posgrado en
Biología para optar por el grado de
Magister Scientiae

REBECA MORA CASTRO

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

2003

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen
por otro regalo
más...

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a las siguientes personas, que me han acompañado y aconsejado durante esta investigación:

Andrés, gracias por toda la objetividad brindada durante la realización de esta investigación y por completar cada día de mi vida con tu compañía y amor.

A Olga y Johnny, gracias por toda una vida de dedicación, alegrías, cuidados, respeto, enseñanzas y amor incondicional.

A Jessica, por ser una gran confidente, amiga, consejera y por compartir conmigo una de las virtudes que más aprecio, la alegría.

A la Dra. Ana Mercedes, gracias por brindarme la oportunidad de un aprendizaje invaluable en su laboratorio y por su disponibilidad, apoyo y orientación constante.

Al Dr. Francisco Hernández y al Dr. Paul Hanson, gracias por toda la ayuda y confianza depositada en mí. Agradezco su respaldo e interés en mi desarrollo como profesional.

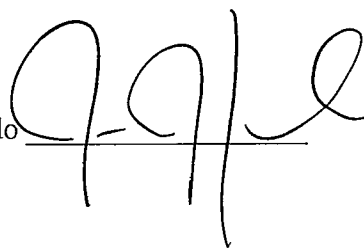
A mi estimado amigo y compañero de laboratorio Glen por fomentar mi interés en el campo de la microbiología. Sin el tiempo, paciencia y conocimientos brindados en los años compartidos, esta investigación hubiera sido irrealizable.

A mis actuales y pasados compañeros y amigos del CIBCM: Cynthia, Adriana, Michael, Elena (s), César, Raúl, Andrés, Rafa, Floria, Alejandro (s), Graciela, Fabián, Carlos, Claudia, Miguel, Erwin, Griselda y Tania por los maravillosos momentos juntos en dónde compartimos consejos, risas y un espíritu de apoyo y amistad.

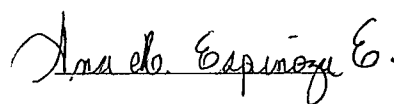
Al personal docente y administrativo de la Escuela de Biología y del CIBCM les agradezco el apoyo brindado para la culminación de este proyecto.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar al grado de *Magister Scientiae*

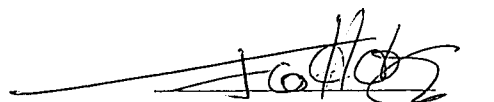
Dr. Jorge Lobo
Representante, Decana del Sistema de Estudios de Posgrado




Dra. Ana M. Espinoza Esquivel
Directora de Tesis



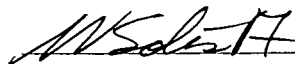
Dr. Francisco Hernández Chavarría
Miembro del Comité Asesor



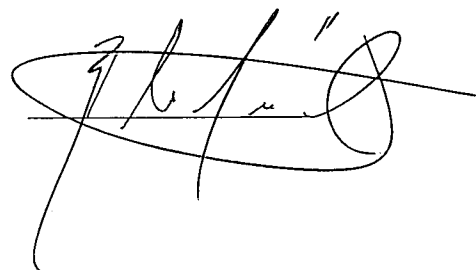
Dr. Paul Hanson Snortum
Miembro del Comité Asesor



Dra. Virginia Solís Alvarado
Directora Programa de Posgrado en Biología



Rebeca Mora Castro
Candidata



INDICE

	Página
Portada.....	i
Firmas.....	ii
Dedicatoria.....	iii
Agradecimientos.....	iv
Indice.....	v

CAPITULO 1

Antecedentes.....	2
I. Introducción, presentación del tema y justificación.....	2
II. Objetivos.....	4
III. Antecedentes.....	4
1.1 <i>Bacillus thuringiensis</i> , bacteria que sintetiza proteínas bioinsecticidas.....	4
1.1.1. Generalidades.....	5
1.1.2. Mecanismo de acción de las delta-endotoxinas.....	12
1.1.3. Uso de <i>Bacillus thuringiensis</i> como controlador biológico.....	16
1.2 Caso de homópteros e insectos susceptibles.....	18
1.2.1 Generalidades de los delfácidos.....	19
1.2.2 <i>Tagosodes orizicolus</i> , plaga del arroz y vector del virus de la hoja blanca (RHBV).....	19
1.2.3 Importancia de <i>Tagosodes orizicolus</i>	20
1.2.4 Consideraciones taxonómicas.....	21
1.2.5 Características generales de la especie.....	21
1.2.6 Plantas hospederas.....	22
1.2.7 Enemigos naturales.....	22
1.3 El virus de la hoja blanca del arroz (RHBV).....	23
1.3.1 Síntomas inducidos por el virus.....	24
1.3.2 Técnicas de control del RHBV y de su insecto vector.....	24
1.4 Bioensayos	

CAPITULO 2

Characterization of a collection of <i>Bacillus thuringiensis</i> strains isolated from homopteran insects from Costa Rican agroecosystems	37
2.1. Abstract.....	38
2.2. Introduction.....	39
2.3. Materials and methods.....	40
2.4. Results.....	42
2.5. Discussion.....	43
2.6. References.....	46

CAPITULO 3

Análisis del modo de acción de la δ -endotoxina GP3 de <i>Bacillus thuringiensis</i> en tejidos del intestino de <i>Tagosodes orizicolus</i> Muir (Homoptera:Delphacidae)	53
3.1. Resumen.....	54
3.2. Introducción.....	55
3.3. Materiales y métodos	57
3.4. Resultados.....	61
3.5. Discusión.....	63
3.6. Referencias.....	65

CAPITULO 4

A novel bioassay procedure to evaluate <i>per os</i> toxicity on the rice delphacid, <i>Tagosodes orizicolus</i> Muir (Homoptera: Delphacidae).....	77
4.1 Abstract	78
4.2 Introduction.....	79
4.3 Materials and methods	81
4.4 Results.....	83
4.5 Discussion.....	85
4.6 References.....	88

CAPITULO 5

Toxicity of <i>Bacillus thuringiensis</i> Costa Rican strains toward the rice pest, <i>Tagosodes orizicolus</i> Muir (Homoptera:Delphacidae), using a novel feeding bioassay system...	99
5.1 Abstract	99
5.2 Introduction.....	100
5.3 Materials and methods	102
5.4 Results.....	103
5.5 Discussion.....	104
5.6 References.....	108

CAPITULO 6

Discusión general y resumen de la metodología y resultados de los capítulos II, IV y V en español	113
6.1 Resumen de la metodología y los resultados de los capítulos II, IV y V en español	114
6.2 Discusión general	126
6.3 Bibliografía	131

INDICE DE CUADROS

CAPITULO 2

Table. 1 Crystal morphology, molecular weights of the δ -endotoxins and genetic profile of a collection of forty-four strains of <i>Bacillus thuringiensis</i> isolated from homopterans of the Costa Rican agroecosystems	49
Table. 2 Genetic profile of forty-four <i>Bacillus thuringiensis</i> strains.	50

CAPITULO 3

Cuadro. 1 Procedencia de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> 40-X-m y 5-X-m.....	69
Cuadro. 2 Determinación mediante el método de Bradford de la concentración (mg/ml) proteica de las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa realizados con las cepas 40-X-m y 5-X-m solubilizadas.....	69
Cuadro. 3 Determinación de la cantidad de tripsina requerida por tratamiento.....	69
Cuadro. 4 Determinación de la concentración (mg/ml) de la proteína CryIAb mediante el método de Bradford.....	70

CAPITULO 5

Table 1. Mortality percentage of <i>Tagosodes orizicolus</i> in coarse bioassays using three loops of fully sporulated cultures in twenty seven strains of <i>Bacillus thuringiensis</i>	111
--	-----

Table 2. Mortality percentage of *Tagosodes orizicolus* in coarse bioassays using
lyophilized spores and crystals observed in eight strains of *Bacillus*
thuringiensis... ..112

INDICE DE FIGURAS

CAPITULO 2

Figure. 1 Diversity in the crystal morphology of forty-four *Bacillus thuringiensis* strains.....51

Figure. 2 Electronic microscopy analysis of the crystal morphology of the strains 40-X-m and 8-S-mb (bar=1.50um).....52

CAPITULO 3

Fig. 1 Gradientes de sacarosa con las cepas 40-X-m y 5-X-m.....70

Fig.2 Gel de poliacrilamida al 10% con las cepas 40-X-m y 5-X-m en donde se observan las diferentes fracciones de los gradientes tratadas con buffer carbonatos.71

Fig.3 Gel de poliacrilamida al 10% con las cepas 40-X-m y 5-X-m en donde se observan las diferentes fracciones de los gradientes tratadas con buffer CAPS.72

Fig.4 Western Blot para observar el resultado de la unión de la biotina a la toxina CryIAb utilizando como sustrato luminol.73

Fig.5 Western Blot para observar el resultado de la unión de la biotina a la proteína CryIAb y a la proteína GP3.....74

Fig.6 Determinación de la concentración de la proteína CryIAb mediante el método de Bradford..... 75

Fig. 7 Localización inmunocitoquímica de las δ -endotoxinas GP3 y CryIAb a los cortes del tejido intestinal de *Manduca sexta* y *Tagosodes orizicolus*.....76

CAPITULO 4

Figure. 1 Vials used for optimizing feeding conditions on bioassays with <i>T. orizicolus</i>	92
Figure. 2 Pupae of <i>H. hernandezae</i> in a rice leaf and <i>T. orizicolus</i> female parasited by <i>H. hernandezae</i>	92
Figure. 3 <i>Cytorhinus lividipennis</i> Reuter nymph (Hemiptera:Miridae) feeding on <i>T. orizicolus</i> eggs.	92
Figure. 4 Mortality percentage of <i>T. orizicolus</i> fifth instar nymphs after six days of feeding on different concentrations of sucrose solutions throught stretched Parafilm membranes.....	93
Figure. 5 Mortality percentage at 72 hours of <i>T. orizicolus</i> third and fourth instar nymphs after feeding on two types of liquid diet through perforated Parafilm membranes.....	93
Figure. 6 Observed average distribution of the mortality of <i>T. orizicolus</i> in three bioassays, after feeding on 1:48 honeybee dilution through perforated Parafilm membranes.....	94
Figure. 7 Observed average distribution of the mortality of <i>T. orizicolus</i> in three bioassays, after feeding on 10% sucrose through perforated Parafilm membranes.....	94
Figure. 8 Mortality percentage of <i>T. orizicolus</i> different instars after six days of feeding on two liquid diets through Parafilm membranes.....	95
Figure. 9 <i>T. orizicolus</i> feeding on drops of stained sucrose diet in glass slides	96

Figure. 10 Mortality percentage of *T. orizicolus* from three Costa Rican rice producing regions after feeding on a 10% sucrose diet through Parafilm membranes under controlled temperature and humidity conditions.....97

RESUMEN

Mora Castro, Rebeca Andrea

Caracterización molecular de una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* e implementación de un sistema novedoso de bioensayo para evaluar su efecto tóxico contra la plaga del arroz, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae)

Tesis de Maestría en Biología. San José, C.R.:

R. Mora. C., 2003

132h.:il.-78refs.

El saltahojas *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae) importante plaga del arroz y vector del virus de la hoja blanca del arroz presenta una amplia distribución en el trópico y subtropico americanos. El principal método de control de este insecto plaga es mediante la aplicación de insecticidas sintéticos de amplio espectro, persistentes y muy tóxicos para los mamíferos. De ahí la necesidad de desarrollar nuevas estrategias sostenibles que permitan disminuir las poblaciones de este delfácido, mediante la utilización de controladores biológicos como la bacteria entomopatígena *Bacillus thuringiensis* (Bt).

Bt es una bacteria que sintetiza cuerpos paraesporales o cristales proteicos constituidos por δ -endotoxinas de acción insecticida. Esta bacteria ocurre naturalmente en el ambiente y se ha logrado aislar a partir de diversos sustratos incluyendo suelo, hojarasca, follaje, polvo e insectos. Se han encontrado δ -endotoxinas activas principalmente contra lepidópteros, coleópteros y dípteros. Sin embargo, existen muy pocos reportes de cepas efectivas contra homópteros. Basándose en la premisa de que existe una coevolución entre esta bacteria y los insectos hospederos, se aislaron cepas de *Bt* a partir de homópteros, para posteriormente probar su efectividad mediante bioensayos contra *T. orizicolus*.

Se aislaron 44 cepas de esta bacteria a partir de colectas de homópteros vivos y muertos en plantaciones agrícolas y zonas aledañas en Costa Rica. Esta colección se evaluó mediante morfología del cristal, pesos moleculares de las δ -endotoxinas y el perfil

de los genes cry que contienen. La mayoría de los aislamientos de *Bt* mostraron patrones diversos de la morfología del cristal: 37 cepas tenían cristales pleomórficos (80%), cuatro cepas mostraron cristales pleomórficos, bipiramidales y ovalados (9%), una pleomórficos y bipiramidales (2%), otra pleomórficos y ovalados (2%) y dos ovalados y bipiramidales (4%). Asimismo, el análisis mediante SDS-PAGE de las δ -endotoxinas mostró patrones electroforéticos muy diversos. Se analizó además mediante PCR el perfil genético de los genes cry y vip que contenían. Diecinueve cepas amplificaron con uno o varios de los genes cry1, cry3, cry7, cyt y vip3, mientras que 23 no amplificaron con ninguno de los imprimadores utilizados (60%). Asimismo, 14 presentaron dos o más genes y 4 cepas amplificaron con el imprimador para el gen cry1. La gran diversidad en cuanto a las morfologías del cristal, patrones electroforéticos y a la ausencia de amplificación con diversos genes cry conocidos sugiere que algunos de estos aislamientos podrían contener proteínas Cry novedosas.

Se propuso además establecer un sistema de alimentación reproducible para *T. orizicolus* con una mortalidad natural menor al 10%, para posteriormente evaluar las cepas de la colección mediante bioensayos.

Para ello se establecieron diversas colonias en un insectario para disponer de abundantes insectos sanos para la estandarización de los bioensayos. El sistema de cría desarrollado permitió mantener la colonia libre de parasitoides y depredadores por más de 12 generaciones. Se demostró que los insectos se alimentaron in vitro a través de membranas de Parafilm de dietas de sacarosa al 10% y miel de abeja diluida 1:48 vol/vol, obteniéndose una mortalidad de 10-15% y 0-5%, respectivamente, por un período de seis días, bajo condiciones controladas de humedad y temperatura. Se demostró además que las ninfas del tercer y cuarto instar presentaron una mortalidad natural menor al 10% en dichos bioensayos. Asimismo, no se observó diferencias en cuanto a la mortalidad natural de los insectos provenientes de tres diferentes localidades.

Posteriormente, se evaluó mediante bioensayos burdos veintisiete cepas de *Bt* (dos cepas de áreas protegidas, 18 aisladas de homópteros y las cepas HD1, HD125, HD137, Bti, Btt, así como las cepas mexicanas GP3 y GP43), usando como inóculo tres

asadas del cultivo bacteriano esporulado. Como resultado de estos bioensayos, ocho cepas mostraron mortalidades superiores al testigo (10%). Posteriormente, se realizaron con estas ocho cepas bioensayos burdos utilizando como inóculo cristales y esporas liofilizados. Seis cepas mostraron mortalidades superiores al 70% (Bti, HD1, GP43, 40-X-m, 26-O-To y 23-O-To). De las cepas anteriores, las últimas dos fueron aisladas a partir de homópteros. Las cepas que exhibieron mayor toxicidad presentaron genes *cryI* y *cyt* con excepción de la cepa *Bti*.

Se analizó mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas la susceptibilidad de *T. orizicolus* a la cepa GP3, efectiva para el control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae). La metodología se estandarizó en intestinos de *Manduca sexta* utilizando la δ -endotoxina *CryIAb* y posteriormente se realizaron los ensayos de unión de la δ -endotoxina GP3 al epitelio intestinal de *T. orizicolus*. Se utilizaron anticuerpos específicos contra la proteína *CryIAb* no biotinada, en el caso de *M. sexta*, y streptavidina-peroxidasa para la GP3, en el caso de *T. orizicolus*. Se observó una unión leve de la toxina GP3 en el epitelio de las células intestinales de *T. orizicolus*, demostrándose una interacción positiva.

Sería interesante en un futuro evaluar mediante ensayos finos las cepas de *Bt* que mostraron porcentajes de mortalidad superiores al 70% en los bioensayos burdos y correlacionar dicha toxicidad con ensayos de unión *in vitro* en el epitelio del intestino medio de *T. orizicolus*.

Palabras clave: *T. orizicolus*, bioensayo, burdo, mortalidad, cepa, *Bacillus thuringiensis*

Director de la Investigación: Dra. Ana M. Espinoza

Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Escuela de Agronomía

CAPÍTULO 1
ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

I. Introducción: presentación del tema y justificación

Se ha estimado la pérdida precosecha en un 13.8% por causa de insectos y otros artrópodos, 11.6% por enfermedades y 9.5% por malezas. Debido a los numerosos efectos colaterales nocivos de los insecticidas sintéticos, ha surgido un creciente interés por estudiar las interacciones entre microbios e insectos durante el último siglo (Van Rie, 2000), lo que llevó a descubrir nuevos microorganismos, enzimas inusuales y compuestos antimicrobianos. Se ha implementado así el uso de medidas de control de insectos menos dañinas al ambiente y a organismos benéficos, como es el uso de bioinsecticidas que ofrecen numerosas ventajas con respecto al control químico. La implementación de esta nueva tecnología redujo la dependencia de los insecticidas sintéticos, (Van Rie, 2000) asimismo, las plantas transgénicas que expresan proteínas insecticidas permiten un mejor control de aquellas plagas difíciles de controlar con productos asperjables.

Los bacilos esporulados constituyen el mayor grupo de microorganismos capaces de infectar y matar insectos. La hemolinfa de los insectos susceptibles constituye para este grupo de bacterias un excelente ambiente nutricional para sus procesos de proliferación vegetativa y esporulación (Glare and O'Callaghan, 2000). *Bacillus thuringiensis (Bt)*, es una bacteria formadora de esporas que presenta actividad insecticida contra numerosas especies de insectos. Esta bacteria incluye diversas cepas con diferentes perfiles de toxinas y por ende actividad insecticida contra un amplio ámbito de insectos y otros organismos. Sin embargo, la ecología y la función de *Bt* en el ambiente es poco conocida y es tema de debate y discusión, debido a su amplia utilización como biopesticida a finales del siglo XX (Glare and O'Callaghan, 2000).

A pesar del amplio uso de *Bt* por más de 50 años, no ha habido informes de infecciones clínicas en humanos, daño a especies benéficas, ni transmisión horizontal ni vertical de la bacteria entre insectos. Poblaciones de insectos resistentes a *Bt* y a sus toxinas específicas, han surgido principalmente en larvas de algunos lepidópteros. Sin embargo, la mayoría de estos experimentos se realizaron con insectos criados en el laboratorio y expuestos constantemente a *Bt*, a excepción de una especie *Plutella xylostela* la cual presentó resistencia a las δ -endotoxinas de *Bt* serovar *kurstaki* y *Bt* serovar *aizawai* en poblaciones de campo. Sin embargo, la baja frecuencia de aparición de casos de resistencia en el campo sugieren que el riesgo de aparición de resistencia es bajo si se realiza un manejo apropiado, (Glare and O'Callaghan, 2000).

Es importante mencionar, que a pesar del uso de *Bt* por varios años en la agricultura y forestales para el control principalmente de lepidópteros, actualmente hay pocos informes de toxinas efectivas contra otros órdenes de insectos. Tal es el caso del orden Homoptera el cual incluye numerosos insectos plaga y vectores de virus, como *Tagosodes orizicolus*, vector del virus de la hoja blanca del arroz. La evaluación de la toxicidad de las cepas de *Bt* se realiza implementando técnicas de bioensayos adaptados a cada especie en particular. Un bioensayo es un procedimiento experimental en el que se pretende determinar la efectividad biológica de un agente sobre una población de insectos (Tejeda y Navarro, 1994). Sin embargo la mayoría de los ensayos se han efectuado con familias de insectos masticadores como larvas de lepidópteros y algunos coleópteros. Las cepas tóxicas permitieron la producción de numerosos productos formulados contra estos órdenes. Por otra parte, los homópteros son pequeños insectos que se alimentan de la savia de diversas plantas hospederas, usualmente gramíneas cultivadas y silvestres, por lo que se requiere la formulación de dietas líquidas y metodologías diferentes que aquellas apropiadas para los insectos masticadores.

Surge entonces la necesidad de desarrollar un bioensayo reproducible para esta especie que permita la evaluación de cepas de *Bt* que además presente valores de mortalidad natural de la población iguales o menores al diez por ciento.

II. Objetivos

El objetivo general de esta investigación fue establecer una colección de cepas de *Bacillus thuringiensis* aislada a partir de homópteros vivos y muertos de diferentes regiones del país y caracterizarla, mediante la morfología de los cristales, el peso de las δ -endotoxinas y los genes *cry* presentes. Además establecer un bioensayo control reproducible para *Tagosodes orizicolus* para posteriormente evaluar las cepas de la colección.

Objetivos específicos:

1. Aislar cepas de *Bt* a partir de homópteros vivos y muertos.
2. Caracterizar las cepas mediante microscopia de los cristales.
3. Caracterizar las cepas mediante el peso de las δ -endotoxinas utilizando SDS-PAGE.
4. Determinar el tipo de genes *cry* presentes en las cepas.
5. Estandarizar las condiciones del bioensayo para *T. orizicolus*.
6. Seleccionar cepas tóxicas para *T. orizicolus* mediante bioensayos burdos y semifinos con las cepas previamente caracterizadas.

III. Antecedentes

Seguidamente, se hará una revisión bibliográfica de temas generales y específicos de los organismos involucrados en esta investigación. Dentro de los temas desarrollados se incluirá la historia de *Bt*, ecología, importancia y mecanismo de acción de las δ -endotoxinas entre otros. También se tratarán temas relacionados con *T. orizicolus* como su planta hospedera, distribución e importancia.

1.1 *Bacillus thuringiensis*, bacteria que sintetiza proteínas bioinsecticidas

1.1.1 Generalidades

Historia

Bacillus thuringiensis es el nombre científico dado a un grupo de bacterias que se a utilizado mundialmente para el control de numerosas plagas de importancia agrícola. Fue descubierta en 1902, en Japón, por el biólogo S. Ishiwata quien aisló la bacteria como agente causal de una enfermedad del gusano de seda, *Bombyx mori*. Sin embargo, aproximadamente 10 años después Berliner encontró la bacteria en Alemania ejerciendo un fuerte control sobre *Anagasta kuehniella*, larva plaga de productos almacenados. Debido a que esta última cepa se aisló en la provincia de Thuringen, se le llamó *Bacillus thuringiensis* (Knowles, 1994). La producción comercial de esta bacteria comenzó en Francia en 1938, bajo el nombre de Sporeine. Sin embargo, por diversas razones, el interés por *Bt* declinó en la década siguiente. El resurgimiento del interés hacia *Bt* se atribuye a Edward Steinhaus, quien la cultivó en 1942 y atrajo la atención sobre el potencial insecticida de *Bt* a través de sus investigaciones (Glare y O'Callaghan, 2000).

Berliner reportó la presencia de cuerpos paraesporales en *Bt* en 1915, sin embargo, las propiedades de estos cristales fueron identificadas mucho después, en particular su solubilidad bajo condiciones alcalinas (Hannay, 1953). En 1955, Hannay y Fitz-James informaron la naturaleza proteica del cristal y Angus (1954) demostró que los cristales eran tóxicos al gusano de seda.

El primer uso comercial de *Bt* en Estados Unidos ocurrió en 1958. El producto comercial Thuricide, basado en *Bt kurstaki* se comercializó en 1957, y Abbot dió a conocer el Dipel en 1970 (Starnes *et al.*, 1993).

A principio de los años 70 se pensó que *Bt* era un patógeno propio de lepidópteros debido a que en un inicio solo se aislaron cepas a partir de estos insectos. Sin embargo, en 1978 se encontró el serovar *israeliensis* capaz de matar mosquitos, y posteriormente se describió el serovar *tenebrionis*, activo contra coleópteros. La búsqueda de cepas de *Bt* novedosas continúa y muchas se han descubierto recientemente. En 1992, Lambert y Peferoen estimaron que existen entre 40000 y 60000 aislamientos de *Bt* distribuidos en colecciones en todo el mundo (Boucias y Pendland1998, Glare y O'Callaghan, 2000).

Características generales

Bt es una bacteria Gram positiva, aerobia facultativa, perteneciente a la familia *Bacillaceae* (Aronson *et al.*, 1986). Este microorganismo se caracteriza por sintetizar cuerpos paraesporales o cristales de naturaleza proteica constituidos por δ -endotoxinas también conocidas como proteínas Cry y Cyt, de propiedades insecticidas. *Bt* ocurre naturalmente en el ambiente y se ha logrado aislar a partir de diversos sustratos incluyendo suelo, hojarasca, follaje, polvo e insectos. Hasta el momento, se han encontrado δ -endotoxinas activas contra lepidópteros, coleópteros, dípteros, himenópteros, ácaros y también contra otros invertebrados como nematodos, gusanos planos y protozoarios (Glare and O'Callaghan, 2000).

Ecología y prevalencia

A pesar de que esta bacteria se aisló inicialmente a partir de lepidópteros muertos, estudios posteriores indicaron que *Bt* se encuentra muy frecuentemente en muestras de suelo. Martin y Travers (1989), usando medios selectivos, analizaron numerosas muestras de suelo colectadas alrededor del mundo. Un análisis de 27.000 aislamientos colectados a partir de 1.100 muestras de suelo, demostró que *Bt* se puede coleccionar de casi cualquier sustrato, incluyendo playas, desiertos y tundra. La incidencia de *Bt* no se asoció con insectos, ya que muchos ambientes con ausencia de insectos contenían la bacteria (Glare y

O'Callaghan, 2000). Sin embargo, se ha demostrado que cuando se inocula en el suelo, las bacterias no se reproducen vegetativamente, por el contrario, entran en una fase de esporulación y declinan en número. Por lo tanto, al no haber crecimiento vegetativo no se puede dar la transferencia de plásmidos entre diferentes cepas de *Bt* en el suelo (Thomas, 2000). Meadows (1993), sugirió varias explicaciones para la presencia de *Bt* en el suelo: *Bt* raramente crece en el suelo pero podrían acumularse las esporas, *Bt* podría ser infectivo a insectos del suelo ó podría crecer en el suelo cuando los nutrientes estén disponibles.

Por otra parte, se han realizado pocos estudios que analicen la presencia natural de *Bt* en el follaje. Smith y Couche (1991), aislaron cepas de *Bt* del follaje de coníferas, árboles deciduos, crucíferas, etc. Se encontró que del 30% al 100% de las bacterias formadoras de esporas presentes en superficies foliares corresponden a *Bt*. Además encontraron que de estos aislamientos muchos presentaron efecto tóxico contra órdenes como: Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Asimismo, Smith y Couche (1991) explicaron la alta densidad de *Bt* en el follaje de plantas y árboles mediante la hipótesis "Guardaespaldas". Esta hipótesis propone a la bacteria como mutualista, por lo que la bacteria se beneficia al mantenerse en el follaje de la planta, mientras que la planta se beneficia de la bacteria protegiéndose contra los insectos herbívoros.

Por último, existen algunas características de *Bt* que apoyan su papel como entomopatógeno, como por ejemplo la alta densidad poblacional que alcanza la bacteria en la hemolinfa de los insectos susceptibles, así como el amplio ámbito de insectos susceptibles. Por otra parte, el gasto de energía que asume la bacteria durante la esporulación para sintetizar las proteínas cristalinas (35% del peso seco de la bacteria), es difícil no considerarlo como una ventaja selectiva. Asimismo, se ha reportado la capacidad de ciertas cepas de inhibir el sistema inmune del hospedero. Un ejemplo de esto es *Bt serovar alesti* que produce dos inhibidores extracelulares del sistema inmune de los lepidópteros de la familia Saturniidae (Edlund et al, 1976). En ausencia del cristal, *Bt* no es capaz de colonizar el intestino de los insectos susceptibles, actuando solo como un pasajero. De esta manera, *Bt* tiene ventaja sobre otras bacterias esporuladas. La hemolinfa del insecto hace posible la transferencia de plásmidos entre diferentes cepas durante la fase

de crecimiento (Jarret y Styephenson, 1990). Sin embargo, la habilidad de esta bacteria de multiplicarse en medios mínimos, el aislamiento de cepas de suelos con ninguna actividad de insectos y la poca habilidad de causar epizootias hacen dudar que este sea el papel de *Bt* en la naturaleza (Glare y O'Callaghan, 2000).

Factores de virulencia producidos por *Bacillus thuringiensis*

La capacidad entomopatógena de *Bt* es atribuida principalmente a las δ -endotoxinas, sin embargo, existen otros determinantes de la virulencia como algunas proteínas secretadas durante la fase vegetativa (VIPs) (Estruch *et al.*, 1996), fosfolipasas (Zhang *et al.*, 1993), proteasas (Lovgren *et al.*, 1990), quitinasas, exotoxinas termolábiles (Schnepf y Whiteley, 1985) y β -exotoxinas (Levinson *et al.*, 1990). Se ha propuesto que estos factores ayudan al proceso de infección del insecto. Muchos de los genes tóxicos de *Bt*, son codificados por ADN extracromosomal, en plásmidos de distintos tamaños (Levinson *et al.*, 1990). Estos genes están usualmente localizados en grandes plásmidos (40-150 Mda) y se ha reportado la presencia de más de un gen por replicon, como por ejemplo *Bt israeliensis* presenta cuatro genes *cry* en un plásmido de 72 Mda. No todos los genes de las endotoxinas de *Bt* se encuentran en plásmidos, algunos están localizados en el cromosoma (Lereclus *et al.*, 1993).

-Delta-endotoxinas

La producción de δ -endotoxinas durante la fase de esporulación es la característica sobresaliente de *Bacillus thuringiensis* (Schnepf *et al.*, 1998). Estas toxinas están contenidas en cristales paraesporales, los cuáles son termolábiles y solubles a pH extremos (Faust *et al.*, 1982). Generalmente, la forma del cristal es bipiramidal, pero se han encontrado cristales de diversas formas y tamaños. La estructura molecular del cristal y su origen en la célula se desconoce. Se sabe que la toxina está presente como una protoxina, la cual se hidroliza a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero (Arévalo, 1996). Algunas cepas contienen inclusiones formadas por una mezcla

de δ -endotoxinas. Por ejemplo, *Bt kurstaki* HD-1 contiene tres δ -endotoxinas Cry1 de 130 kDa y dos Cry2 de 70 kDa en el mismo cristal (Glare y Callaghan, 2000). Se ha observado que los cristales varían en solubilidad y susceptibilidad hacia las enzimas intestinales (Faust *et al.*, 1982). Los primeros trabajos de genética de *Bt*, describieron la presencia de un gen que codifica para la proteína del cristal en un plásmido. Actualmente existen numerosos informes sobre la identificación de las proteínas del cristal, así como de la clonación y secuenciación de los genes que las codifican. En 1989, se sugirió que los genes *cry* codifican por las proteínas insecticidas Cry, cuyos pesos moleculares oscilan entre 14-160 kDa (Glare and O'Callaghan, 2000).

Además de producir las toxinas Cry, algunas cepas de *Bt* también producen endotoxinas citolíticas (Cyt), de 25-28 kDa. Las endotoxinas Cyt se depositan conjuntamente con las δ -endotoxinas Cry en cuerpos de inclusión cristalinos y muestran una amplia actividad citolítica *in vitro* así como especificidad a larvas de dípteros *in vivo*. La amplia actividad citolítica se atribuye a su alta hidrofobicidad y su afinidad por los lípidos de la membrana (Pandelakis y Ellar, 1994).

-Alfa-exotoxina

La α -exotoxina conocida también como fosfolipasa C o lecitinasa, es capaz de lisar diversos tipos de células, principalmente al afectar los fosfolípidos de la membrana causando la acción lítica o necrosante. Estudios sobre la biosíntesis de la lecitinasa producida por *Bt*, demostraron que ésta aparece en la fase de crecimiento logarítmica. Es una proteína termolábil, estable en un ámbito amplio de pH de 3.0-9.0 y es estable en presencia de tripsina y urea 8 M. Se ha encontrado susceptibilidad por parte de algunos insectos como *Galleria mellonella*, *Plutella maculipennis*, hacia esta toxina. Aún no se tiene muy claro el papel de esta enzima (Arévalo, 1996).

-Beta-exotoxina

En 1973, Faust, reporta que esta toxina es un producto extracelular, dializable, soluble en agua y termoestable a 120°C por 15 min., el cual es producido durante la fase de crecimiento exponencial por algunas cepas de *Bt*. Esta toxina tiene un amplio espectro de toxicidad, matando insectos de los órdenes: Lepidoptera, Hymenoptera, Hemiptera, Diptera, Isoptera, Nematoda y Orthoptera. La producción de esta toxina no está asociada con la formación de cristales y esporas, ya que se produce aún en su ausencia. Se ha estipulado que esta toxina inhibe la biosíntesis del ARN (Beebee and Bond, 1973) y es más tóxica administrada parenteralmente que ingerida. Asimismo, no pasa a través de la pared intestinal siendo degradada por las fosfatasa del intestino. Los insectos expuestos a la β -exotoxina cesan de comer y mueren a los pocos días de la exposición. Esta toxina puede ocasionar efectos teratogénicos interrumpiendo el desarrollo larval o pupal. Asimismo, los adultos que sobreviven la exposición a esta toxina, son menos longevos y reducen su fecundidad. La β -exotoxina es capaz de atravesar las membranas nucleares y celulares en mamíferos, asimismo, los vertebrados expuestos a esta toxina muestran lesiones en hígado y riñones. Debido a la toxicidad hacia vertebrados, se debe corroborar la ausencia de β -exotoxina en los ingredientes activos de *Bt* que se vayan a incorporar en productos comercializables (Glare y O'Callaghan, 2000). El método comúnmente usado para determinar la presencia de esta toxina son los bioensayos con larvas del tercer estadio de *Musca doméstica*, las cuales no se desarrollan en adultos morfológicamente normales al entrar en contacto con esta toxina (Dunn, 1960).

- Proteínas insecticidas de la fase vegetativa (vips)

Recientemente, se informó una nueva clase de toxinas insecticidas, llamadas proteínas insecticidas de la fase vegetativa (vips). Como sugiere el nombre, estas proteínas alcanzan un nivel máximo de expresión durante la fase de crecimiento logarítmica, detectándose aún durante y después de la esporulación (Estruch *et al.*, 1996). Estas toxinas, presentan un amplio espectro de toxicidad contra el epitelio intestinal de lepidópteros y coleópteros, ocasionando la lisis celular, que es el principal causante de la mortalidad (Arévalo, 1996). Es importante mencionar que en estudios con proteínas insecticidas Vip3A se informó un 100% de mortalidad al agregar 62 ng/ml de dieta. Esta

cantidad de proteína es aproximadamente 260 veces menor que la cantidad necesaria de proteína CryIA para alcanzar únicamente un 50% de mortalidad (Estruch, 1996). Las proteínas Vips, se secretan al medio, por lo que se les detecta en sobrenadantes de cultivos. A diferencia de otras proteínas secretadas, la proteína Vip3A no es procesada en el extremo N-terminal durante la exportación.

- Quitinasas

La producción de enzimas quitinolíticas se ha detectado en una gran variedad de organismos, incluyendo aquellos que contienen quitina, como insectos, crustáceos, levaduras y hongos, así como en seres que carecen de dicho polisacárido, como bacterias, plantas virus y vertebrados (Sampson y Gooday, 1999). En cada uno de ellos las quitinasas cumplen una función particular de acuerdo a las características y necesidades propias de cada especie. Se ha demostrado que las enzimas quitinolíticas pueden actuar como agentes antagónicos para hongos e insectos que constituyen plagas para cultivos. A pesar de que los insectos producen quitinasas como parte de su ciclo de vida, la exposición ante estas enzimas en etapas en las que no son necesarias les resulta perjudicial. Ding y colaboradores en 1998 demostraron que plantas de tabaco transgénicas que expresaban constitutivamente un gen de quitinasa adquirían una mayor resistencia ante ciertos insectos plaga. Sin embargo, el mayor potencial de las enzimas quitinolíticas para el control biológico de insectos proviene de su actividad sinérgica con las toxinas insecticidas de *Bacillus thuringiensis* (Smirnoff, 1977).

Las primeras evidencias experimentales de un efecto sinérgico entre las quitinasas y las proteínas Cry de *Bt* provienen del trabajo de Smirnoff en los años 70. Este investigador demostró un aumento en la actividad insecticida de *Bt* contra larvas de *Choristoneura fumiferana* en presencia de enzimas quitinolíticas bacterianas (Smirnoff, 1977). Este efecto sinérgico se debe a una alteración en la membrana peritrófica del insecto. Dicha membrana es una cubierta cilíndrica que separa el epitelio de la luz del intestino, está conformada por una red de quitina embebida en una matriz de proteínas y carbohidratos y constituye una barrera física contra el daño mecánico y la invasión por

microorganismos (Dow, 1986). Se ha demostrado *in vitro* que la membrana peritrófica limita la penetración de proteínas Cry disueltas (Dow, 1986). Por lo tanto el sinergismo entre las quitinasas y las proteínas Cry se debe a que las primeras degradan parte de la membrana peritrófica, facilitando el acceso de las segundas a las células epiteliales (Sampson y Gooday, 1998).

1.1.2 Mecanismo de acción de las δ -endotoxinas

Estructura de la toxina y clasificación

Uno de los sistemas oficiales de clasificación para Bt es manejado por el Instituto Pasteur de París, Francia en donde la clasificación está basada en las características antigénicas del flagelo “antígeno H”. Este Instituto tiene un cepario internacional con aproximadamente 45 grupos serológicos “H” y 59 variedades diferentes aisladas de diversos hábitat en todo el mundo (Rodríguez *et al.*, 1996).

Un sistema de clasificación diferente al anterior fue establecido en 1989 por Hofte y Whiteley, quienes clonaron, secuenciaron y compararon los genes que codifican para las proteínas del cristal. Sin embargo, dicha clasificación empezó a presentar problemas cuando se encontraron proteínas Cry muy semejantes pero con diferente especificidad, o toxinas Cry con actividad dual hacia dos órdenes de insectos diferentes. Por lo tanto en Setiembre de 1996 Neil Crickmore publicó una actualización de esta clasificación, cuya nueva nomenclatura se basó exclusivamente en la similitud de la secuencia de aminoácidos de las proteínas Cry (Crickmore *et al.*, 1998). Hasta la fecha se han clonado y secuenciado 166 genes *cry* diferentes y 16 genes *cyt*. Basándose en esta clasificación la mayoría de las toxinas de *Bt* se clasifican como proteínas "Cry" altamente específicas para células de insectos *in vivo* e *in vitro*.

Alternativamente, se ha propuesto que la especificidad de los aislamientos se relaciona muchas veces con la morfología de los cristales, lo cual significa que las cepas que contengan cristales de morfología diferente a las descritas, posiblemente contengan también proteínas novedosas, de manera que se puede utilizar la forma del cristal como un primer criterio para luego analizar mediante técnicas moleculares y por bioensayos, la toxicidad de los aislamientos.

Se ha demostrado por estudios de proteólisis *in vitro* y análisis de delección que el fragmento tóxico de las δ -endotoxinas está localizado en el extremo N-terminal de las proteínas. En tanto que, el extremo C-terminal no se requiere para la actividad tóxica (Glare and O'Callaghan, 2000). A la fecha se han reportado las estructuras tridimensionales de tres toxinas Cry, la toxina Cry1Aa específica para lepidópteros, la toxina Cry3A específica para coleópteros y la toxina Cry2Aa con actividad dual para dípteros y lepidópteros (Li *et al.*, 1991). A pesar de que estas toxinas, no comparten un porcentaje alto de identidad a nivel de secuencia de aminoácidos, existe entre ellas un plegamiento estructural similar compuesto por tres dominios. El dominio I está formado por siete alfa-hélices anfipáticas que desempeñan un papel relevante en la formación del poro en la membrana. El dominio II está formado por tres láminas beta antiparalelas que terminan en asas en el vértice de la molécula y participan en el reconocimiento y unión a un receptor o receptores localizados en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio de insectos susceptibles. Por último el dominio III, se caracteriza por una estructura de β -emparedado. Existe mucha controversia en cuanto a la función que desempeña el dominio III, asociándolo con diferentes funciones: estabilidad de la estructura de la proteína y protección contra la proteólisis, participación en la formación del poro, así como el reconocimiento del receptor (Li *et al.*, 1991). Es importante mencionar que el alineamiento de las secuencias de aminoácidos entre múltiples toxinas Cry ha indicado la existencia de cinco bloques conservados que se localizan en las regiones centrales y de contacto entre los dominios, lo cual hace suponer que la estructura tridimensional está muy conservada (Hofte y Whiteley, 1989).

Efectos histopatológicos y análisis de unión

La elucidación del modo de acción de las proteínas del cristal de *Bt* comenzó a partir de estudios de histopatología. Poco después de que la larva ha ingerido los cristales de *Bt*, las células epiteliales del intestino medio del insecto susceptible, comienzan a vacuolizarse y son arrastradas hacia el lumen. Consecuentemente ocurre parálisis del intestino medio y finalmente parálisis completa del insecto (Honée y Visser, 1993). La respuesta fisiológica al ingerir los cristales de *Bt* incluye un aumento en el pH y concentración de K^+ en la hemolinfa, lo que aparentemente provoca que el insecto deje de comer. Asimismo, el insecto presenta vómito, diarrea, y muerte por septicemia (Aronson *et al.*, 1986).

La unión de las δ -endotoxinas a su receptor, se ha demostrado mediante experimentos *in vivo* e *in vitro* en el tejido intestinal de insectos plaga. Empleando métodos inmunocitoquímicos se ha demostrado que las δ -endotoxinas se unen *in vivo* solamente a las microvellosidades apicales (MVA) de las células epiteliales del intestino medio de los insectos susceptibles y no se ha observado translocación de las toxinas hacia otros órganos del insecto, por lo que se concluye que esta membrana es donde la toxina ejerce sus actividad (Bravo *et al.*, 1992 a y b). En insectos no susceptibles, las toxinas se localizan en el lumen intestinal y en la membrana peritrófica.

Mecanismo

El mecanismo de acción de las δ -endotoxinas de *Bt* en las especies de insectos susceptibles es todavía motivo de investigación. El modelo propuesto hasta ahora para

larvas de lepidópteros y algunos coleópteros es el siguiente: los cristales proteicos liberados durante la esporulación de *Bt* son ingeridos por el insecto. Posteriormente, son solubilizados en las condiciones de pH extremo del intestino medio, y las proteasas del intestino del insecto transforman los monómeros de protoxina en toxina activa. La toxina activa se une a receptores presentes en las microvellosidades apicales de las células epiteliales intestinales para posteriormente insertarse en la membrana celular y formar canales iónicos, que permiten el libre flujo de líquido y iones, causando la muerte del insecto por parálisis intestinal y septicemia (Aranda, 1996).

Solubilización y procesamiento de las protoxinas Cry Los cristales producidos por las diversas cepas de *Bt* son insolubles, excepto a pH altos, la insolubilidad es parcialmente conferida por puentes de disulfuro. Estas proteínas Cry depositadas como cristales deben ser ingeridas por el insecto susceptible para causar efecto letal. El intestino medio las larvas de lepidópteros se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras, requerimientos indispensables para la pronta disolución de las δ -endotoxinas. Diferencias en el grado de solubilización algunas veces explican diferencias en el grado de toxicidad de las proteínas Cry (Aronson *et al.*, 1991). Por otra parte se cree que una disminución en la solubilidad de la protoxina es un mecanismo potencial en la resistencia de insectos (Aronson *et al.*, 1991). La estructura de la toxina Cry3A reportada por Li y colaboradores reveló que carece de puentes disulfuro, sin embargo existen por lo menos cuatro puentes salinos que estabilizan dicha estructura. Esto podría explicar las propiedades de solubilidad de la toxina, la cual se disuelve tanto a pH 10 como a pH 4 (Knowles, 1994). La mayoría de las δ -endotoxinas se producen como protoxinas que para ser activas deben ser procesadas por las proteasas del intestino de los insectos. La mayoría de proteasas del intestino medio de lepidópteros son del tipo tripsina. Las protoxinas de 130 a 135 kDa ejemplificadas por las Cry1A se digieren progresivamente del extremo carboxilo hacia el extremo amino, dando como producto un fragmento resistente de aproximadamente 55 a 65 kDa. Se cree que como el extremo carboxilo no es esencial para la toxicidad del insecto y como contiene muchos residuos de cisteína podría participar en la cristalización de la protoxina y la protección de la toxina del procesamiento proteolítico (Knowles, 1994).

Unión al receptor La toxina activada, se une a receptores específicos en las microvellosidades de las células columnares de las microvellosidades del epitelio intestinal del insecto susceptible. La unión de la toxina a su receptor es un evento bifásico, que involucra primero la unión de acercamiento inicial de la δ -endotoxina a la membrana de la célula epitelial intestinal (unión reversible) y un paso posterior irreversible donde la toxina, por medio de uno o más dominios específicos, se integra o inserta en la matriz membranal para formar un poro o canal iónico. Se cree que en *Manduca sexta*, el receptor de la toxina Cry1Ab es una proteína de membrana tipo cadherina, de 210 kDa (Schnepht, 1998). Sin embargo, los receptores de las toxinas Cry1Ac y Cry1C se han identificado como aminopeptidasas con pesos moleculares de 120 y 160 kDa respectivamente (Schnepht, 1998). Asimismo se ha propuesto a la fosfatasa alcalina como un posible receptor de Cry1Ac (Sangadala *et al.*, 1994). Es importante mencionar que los patrones de unión de las toxinas son bastante complejos, ya que una toxina puede tener más de un sitio de unión en un mismo insecto y más de un tipo de toxina puede competir por un mismo sitio de unión (Knowles, 1994).

Inserción a la membrana y formación de poro A partir de estudios *in vitro* se ha comprobado que las proteínas forman oligómeros, asimismo la formación de éstos constituye una parte importante del mecanismo de la formación del poro. Bravo y Guereca (1999), demostraron que las toxinas Cry1Aa, Cry1Ac, Cry1C, Cry1D y Cry3A forman en solución oligómeros de no menos de 10 subunidades, asimismo, la investigación sugiere que la formación de oligómeros ocurre después de que la toxina se une al receptor y se inserta en la membrana. La hipótesis que se ha planteado en relación al mecanismo a partir del cual las toxinas de *Bt* inducen la formación del poro y dañan las células intestinales se basa en que las δ -endotoxinas causan la muerte de las células epiteliales al inactivar el sistema que mantiene el gradiente de pH o por citólisis osmótica (Glare y Callaghan, 2000).

1.1.3 Uso de *Bacillus thuringiensis* como controlador biológico

La utilización de los insecticidas sintéticos, dio inicio alrededor de la década de 1940, con el propósito de controlar plagas de insectos. Sin embargo, el uso desmedido de estos compuestos ha tenido consecuencias graves sobre la salud humana, la alteración de los ciclos biológicos en los ecosistemas al perjudicar su fauna y ha propiciado la aparición de plagas resistentes. Esto ha impulsado la búsqueda de alternativas de control biológico, basadas en su mayoría en microorganismos entomopatógenos. En los últimos años se ha generado una creciente preocupación por desarrollar procesos productivos menos dañinos lo cual ha favorecido el desarrollo de tecnologías más favorables al ambiente y al surgimiento de formas de producción alternativas como la agricultura orgánica y la producción de plantas transgénicas resistentes a insectos.

Bt se ha utilizado en las últimas décadas en la formulación de biopesticidas para el control biológico de plagas de importancia económica en la agricultura (Aronson *et al.*, 1986). En la actualidad, la tecnología de *Bt* se encuentra disponible en forma de bioinsecticidas basados en formulaciones de esporas y cristales (Dipel[®], Thuricide[®]). Las cepas de *Bt* utilizadas en estos productos son las variedades israelensis, kurstaki y berliner, las cuales resultan efectivas únicamente para el control de ciertas especies como mosquitos, lepidópteros y coleópteros respectivamente. La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA), formuló 182 productos de *Bt*, en 1995. Sin embargo, las formulaciones de *Bt* constituían menos del 2% del total de ventas de todos los insecticidas en 1999. No obstante, el uso de estos productos se ha incrementado recientemente debido a la aparición de insectos resistentes a los insecticidas sintéticos y al auge de la producción de cultivos orgánicos. En 1987, hubo reportes que demostraron que los genes que codifican para las proteínas insecticidas de *Bt* podían ser introducidos y expresados en tejidos de planta, dando como resultado plantas transgénicas resistentes a plagas. Un reflejo de esto es que un 69% del algodón, 26% del maíz y 68% de la soya cultivados en Estados Unidos han sido modificados genéticamente con genes de *Bt*, en el año 2001 (Estruch *et al.*, 1996)

El uso de *Bt* reduce problemas de gran magnitud como la contaminación ambiental con plaguicidas sintéticos, el desarrollo de resistencia y los efectos negativos en la salud humana. Así mismo, es un recurso para la expresión de nuevos genes de resistencia

a ciertas plagas y su expresión transgénica en plantas (Glare y Callaghan, 2000). Además, la diversidad genética de *Bt* ofrece la posibilidad de clonar sus genes o producir proteínas híbridas que constituyen ventajas importantes para prevenir el desarrollo de resistencia (Aranda, 1996).

1.2. Caso de homópteros y insectos susceptibles

La mayoría de cepas de *Bt* son activas contra lepidópteros, y en menor proporción contra coleópteros y dípteros; recientemente, se ha informado de toxicidad contra órdenes como: Hymenoptera, Orthoptera, Homoptera y Mallophaga (Schnepf *et al.*, 1998). Debido a la poca diversidad de proteínas *cry* formuladas como bioinsecticidas hasta ahora, es necesaria la búsqueda de toxinas con nuevas especificidades ya que una gran cantidad de insectos plaga (por ej. homópteros e himenópteros) no han sido controlados con los bioinsecticidas disponibles en el mercado. Posiblemente esta falta de información se deba a la dificultad de optimizar un bioensayo para insectos chupadores.

En el caso de los homopterous, en general existe una falta de información acerca de la composición del lumen del intestino, como por ejemplo, la composición enzimática y el pH, información que es conocida para las larvas de lepidópteros y coleópteros. Sin embargo, se han descrito ciertas enzimas salivares como esterasas y algunas enzimas provenientes de las glándulas accesorias como amilasas, maltasas, invertasas y proteinasas en chinches, en donde el pH intestinal es de 6,8 a 7 y de 9 dependiendo de la especie (A.T. Dow, 1986). La falta de dicha información en homópteros hace difícil predecir si las enzimas digestivas del insecto son capaces de procesar la protoxina a toxina activada, para que esta forme el poro y consecuentemente inicie su efecto tóxico en el epitelio intestinal.

1.2.1 Generalidades de los delfácidos

La familia Delphacidae perteneciente a la super familia Fulgoroidea, es la más grande y estudiada del orden Homoptera, incluye más de 20.000 especies clasificadas en 300 géneros. La identificación a nivel de familia se basa en la presencia de un espolón móvil en la base de cada metatibia; asimismo, la genitalia del macho constituye una herramienta importante para su clasificación (Wilson y Claridge, 1991). Los delfácidos son insectos exclusivamente fitófagos que se alimentan generalmente de gramíneas cultivadas y silvestres (Wilson *et al.*, 1994). Dentro de esta familia se encuentran numerosas especies vectores de enfermedades virales como *Tagosodes cubanus*; transmisor del virus de la hoja blanca de *Echinochloa* (Madriz, 1998); *Peregrinus maidis*; transmisor del virus del estriado del maíz; *Laodelphax striatellus*; transmisor del virus estriado del arroz, *Tagosodes orizicolus*; transmisor del virus de la hoja blanca del arroz (Falk *et al.*, 1987). Los delfácidos causan daño directo al succionar la savia del floema y al ovipositar en el tejido foliar de la planta atacada. Dentro de la familia Delphacidae, el género *Tagosodes* reúne aproximadamente 20 especies distribuidas en áreas tropicales y subtropicales del mundo, de las cuales 9 pertenecen al Neotrópico. Dos especies viven sobre cultivos de arroz (*Oryza sativa*): *T. orizicolus* (Muir, 1926) en América y *T. pusanus* (Distant, 1912) en Asia (Wilson y Claridge, 1991).

1.2.2 *Tagosodes orizicolus*, plaga del arroz y vector del RHBV

Esta investigación involucra al homóptero *Tagosodes orizicolus*, comúnmente conocido como sogata. Nuestro interés radica en que este insecto es el vector natural del RHBV, virus de la hoja blanca del arroz y produce daño directo al ovipositar y alimentarse

de la planta de arroz. Por ende, representa uno de los principales factores limitantes de la producción arrocería en América Tropical. Además, las estrategias de control utilizadas para mantener bajas las poblaciones de este insecto en el campo incluyen la utilización de insecticidas sintéticos de alta toxicidad. Por lo tanto, siendo *Bacillus thuringiensis* una estrategia mundialmente utilizada en el control de plagas, pretendemos buscar cepas tóxicas contra *T. orizicolus*. Esto además ayudaría a esclarecer las interacciones de *Bt* con los homópteros, siendo hasta el momento totalmente desconocidas debido a la ausencia de cepas tóxicas para los insectos chupadores dentro de este orden.

1.2.3. Importancia de *T. orizicolus*

T. orizicolus es el vector natural del “virus de la hoja blanca” del arroz (RHBV) en el trópico y subtropico americanos y representa además uno de los principales factores limitantes de la producción arrocería por los daños mecánicos que causa a la planta al alimentarse y ovipositar. Mora y colaboradores (2001) describieron al ovipositor de esta especie como una estructura esclerotizada con bordes aserrados y de forma lanceolada, caracteres especializados para romper el tejido de la planta e insertar los huevos. La enfermedad que transmite, conocida como “hoja blanca”, se ha registrado en Cuba, Venezuela (Atkins y Adair, 1957), Panamá (Cralley, 1957), Colombia (Bernal, 1939), Estados Unidos (Atkins *et al.*, 1958), Surinam (Van Hoof, 1959), El Salvador (Atkins y Lamey, 1959), Honduras (Anónimo, 1959), Guatemala (Schieber y Sosa, 1960), México (Jennings y Beachell, 1960), Puerto Rico (Everet y Lamey, 1969), Ecuador, Brasil (Elías, 1963), Nicaragua, República Dominicana, Perú (Atkins, 1966), Belice (Dávalos, 1997) y en Costa Rica se conoce desde 1954 (Atkins y Adair, 1957). Todos los cultivares comerciales de arroz, que se siembran actualmente, son susceptibles al RHBV y a su insecto vector. Lo anterior favorece la diseminación de *T. orizicolus* y del RHBV, al no existir cultivares con resistencia o tolerancia que actúen como barrera genética (Hernández *et al.*, 1989).

1.2.4 Consideraciones taxonómicas

T. orizicolus, fue descrita por Muir en 1926 como *Sogata orizicola* basándose en 10 ejemplares machos y dos hembras provenientes de Guyana, destacando como carácter diagnóstico la coloración del cuerpo y la conformación del segmento genital del macho (Mariani y de Remes Lenicov, 2001). El investigador Fennah en el año 1936 lo trasladó al género *Sogatodes* y los investigadores Ishihara y Nasu cambiaron el nombre de la especie *orizicola* por *oryzicola*, debido a su relación con el arroz. El mismo Ishihara retoma el nombre *Sogatodes orizicola* respetando la descripción inicial, debiendo tenerse claro que el insecto se denominó también *Sogata brasiliensis* (Muir) hasta 1965 (O'Brien and Wilson, 1985). Asche y Wilson en 1990 comprobaron que el género *Sogatodes* (Fennah) era sinónimo del género *Sogatella*, por lo que varias especies hasta el momento clasificadas como *Sogatodes* fueron trasladadas a otros géneros, utilizando como criterio la genitalia del macho. De la misma manera, estos autores describieron el género *Tagosodes* para incluir en él a un grupo de especies anteriormente ubicadas en *Sogatodes*. En consecuencia, la especie conocida como *Sogatodes orizicola* pasó a denominarse *Tagosodes orizicolus* (Muir) (O'Brien and Wilson, 1985).

1.2.5 Características generales de la especie

Dentro de esta especie existen formas macrópteras y braquípteras, las últimas son usualmente hembras. Las ninfas y las hembras se alimentan de las partes basales de la planta, mientras, los machos, que son alados y más activos, usualmente se encuentran en las partes superiores de la planta (Everett, 1969). Las hembras miden de 3 a 4 mm de longitud, son de color amarillo claro, y sus alas son translúcidas con un tono cafésuzo. Los machos miden de 2 a 3 mm y su coloración es más oscura, además, presentan una mancha

oscura en la parte distal de las alas anteriores (Mora *et al.*, 2001). El macho adulto es fértil 16 horas después e inicia el cortejo que consiste de la emisión de pulsos repetidos que presentan patrones temporales y velocidad distintivos para la especie. Las hembras copuladas ovipositan al tercero o quinto día de alcanzar la madurez y colocan diez huevos por día dando como resultado una producción total de aproximadamente 161 huevos (McMillian, 1960). El período de incubación de los huevos varía en los diferentes meses del año, influido por las temperaturas de cada época, oscilando entre los 15 a los 30 días. Los huevos son blancos casi transparentes y curvos. Su tamaño es de 0,7 mm de largo aproximadamente. *T. orizicolus* presenta cinco estadios ninfales, cada estadio dura de tres a siete días dependiendo de la temperatura y humedad (Everett, 1969). Las ninfas son ápteras de color blanco con dos franjas dorsales, las cuales se oscurecen con la edad (Mora *et al.*, 2001). La longevidad difiere en las hembras y los machos, el tiempo de vida de las hembras es de 20 a 40 días y el de un macho es de 14 días (O'Brien and Wilson, 1985). Una temperatura promedio entre 25°C a 30°C, representa las condiciones más favorables para el incremento de la densidad de la población de *T. orizicolus*. Las temperaturas inferiores a 25°C, así como las grandes oscilaciones térmicas, tienen influencia negativa sobre el crecimiento y desarrollo del insecto.

1.2.6 Plantas hospederas

T. orizicolus solo afecta el arroz, su principal planta hospedera es *Oryza sativa*. Sin embargo, Hernández y Espinoza (1998, no publicado) comprobaron que la otra planta hospedera es *O. glumaepatula*, en donde el insecto realiza exitosamente todo su ciclo de vida, bajo condiciones de invernadero.

1.2.7 Enemigos naturales

Existen pocos estudios referidos al desempeño de los enemigos naturales de esta especie. Se ha demostrado la eficiencia de *Haplogonatopus hernandezae* (Olmí) como parasitoide y depredador de esta especie (Hernández y Belloti, 1984). Como depredadores se han reportado representantes de las familias Reduvidae (Hemiptera), Syrphidae (Diptera), Coccinellidae y algunas especies de arañas como *Paramagrus perforador*. El género *Elenchus* (familia: Elenchidae) se ha reportado parasitando ninfas y adultos y el género *Anagrus* de la familia Mimaridae parasitando huevos.

1.3. El virus de la hoja blanca del arroz (RHBV)

El RHBV, pertenece al grupo de los tenuivirus y fue descrito en 1983. Todos los miembros del grupo, infectan gramíneas y son transmitidos por delfácidos (Gyngery *et al.*, 1981), por lo que su distribución geográfica se relaciona estrechamente con la de sus vectores. El RHBV constituye una de las principales limitantes en la producción de este cultivo, debido a que reduce la producción y puede provocar pérdidas de hasta el 100% si las variedades sembradas son muy susceptibles al virus (Orellana, 1981). El RHBV es transmitido en forma circulativa propagativa por el delfácido *T. orizicolus*. Además, estos virus logran invadir los ovarios de las hembras, por lo que cerca de un 80% de las ninfas son infectivas al nacer (Showers y Evertt, 1967). Se ha comprobado que el virus provoca en el insecto una disminución en la fertilidad y en la longevidad (Lobatón y Martínez, 1976).

1.3.1 Síntomas inducidos por el virus

La severidad de la enfermedad depende de la edad de la planta en el momento de la infección, de la variedad, de las poblaciones del vector en el campo y de su eficiencia de transmisión (Hernández *et al.* 1989). La enfermedad se manifiesta como pequeñas estrías

cloróticas discontinuas a lo largo de las venas, vainas y lámina foliar. Asimismo las panículas de las plantas infectadas producen poca o ninguna semilla (Ziegler *et al.*, 1994). Cuando la infección ocurre en los primeros estadios de desarrollo, las plantas pueden morir (Morales y Niessen, 1985).

1.3.2 Técnicas de control del RHBV y de su insecto vector

Uno de los métodos más utilizados para el combate de esta virosis, es la aplicación de insecticidas químicos para disminuir las poblaciones del vector. Dependiendo de la dinámica poblacional del insecto así es el número de aplicaciones durante el ciclo del cultivo. Los insecticidas más comúnmente usados son: organofosforados y carbamatos (Etofenprox, Imidacloprid, Acetamiprid, Monocrotofos, Vamidothion). Sin embargo, este método de combate de la enfermedad es poco efectivo ya que se requieren pocos vectores para diseminar el virus en el campo. Además, una vez que el cultivo ha macollado, las ninfas y las hembras no son afectadas por el insecticida, por ubicarse en sitios en donde este difícilmente llega. Los insecticidas sintéticos no son específicos por lo que afectan a insectos benéficos y a enemigos naturales del insecto blanco. Además, son altamente tóxicos y tienen efecto residual lo que contribuye negativamente en la alteración y deterioro del agroecosistema y sus alrededores.

1.4 Bioensayos

Una revisión de la literatura relacionada con los aspectos teóricos del bioensayo, método indispensable para determinar la toxicidad de las δ -endotoxinas de *Bt* contra *T. orizicolus*. En virtud de la importancia que tiene el bioensayo, se desarrollaron temas como descripciones de metodologías de bioensayo, factores que afectan la mortalidad en el bioensayo y tiempo de exposición de las toxinas.

Banki (1978), señaló al bioensayo como un procedimiento experimental para determinar la efectividad biológica de una sustancia, en este caso las δ -endotoxinas de *Bt*. El bioensayo estima el nivel del estímulo necesario para obtener una respuesta en determinada proporción de los individuos tratados. Busvine (1971) señaló que por razones estadísticas, el problema se reduce a determinar el estímulo necesario para obtener una respuesta de 50% de los organismos de prueba, este valor se denomina "dosis letal media" (DL50) y es una expresión cuantitativa de la tolerancia de una especie a un tóxico bajo ciertas condiciones experimentales. Existen expresiones alternas a la DL50, como CL50 (concentración letal media) y TL50 (tiempo letal medio) cuyo empleo varía de acuerdo con el procedimiento de bioensayo empleado. Con respecto a lo anterior Busvine (1971) sugirió utilizar el término dosis solo en aquellos ensayos en los que exista certidumbre en la cantidad exacta de toxina que consume el insecto, dejando el término concentración para aquellos casos en los que el insecto se expone a un ambiente contaminado con el tóxico.

En el caso de los bioensayos reportados con *Bt* usualmente no se determina la DL50 ya que es muy difícil determinar qué dosis exactamente consumió el insecto. Por lo tanto, generalmente se mezcla la dieta a utilizar con el inóculo (mezcla de esporas y cristales o cristales purificados de *Bt*) o se coloca este sobre la superficie de una dieta sólida con el fin de determinar la CL50. Ambos parámetros se determinan únicamente mediante la realización de bioensayos finos. Esto nos lleva a mencionar que existen dos tipos de bioensayos: los burdos, que son cualitativos y se utilizan para tamizar preliminarmente cepas de *Bt* usando una concentración alta de inóculo. Por otra parte, los bioensayos finos determinan la concentración del inóculo necesaria para matar el 50% de la población (CL50) usando rangos de concentración delimitados (Tejeda y Navarro, 1994).

La respuesta a un tóxico puede variar entre razas, estadios y sexos de una misma especie, y depende del procedimiento experimental o del método empleado para medir la respuesta (Tejeda y Navarro, 1994). Las diferencias en la susceptibilidad de los diferentes estadios del ciclo de vida de los insectos se deben presumiblemente a los cambios

anatómicos, fisiológicos y de tamaño. Por esta razón, las diferencias en susceptibilidad se manifiestan más en individuos con metamorfosis completa que en los que presentan metamorfosis parcial (Tejeda y Navarro, 1994). Del mismo modo, la susceptibilidad en cada etapa de la vida del insecto, está afectada por diferentes causas: desarrollo y cambios asociados a la muda en larvas y ninfas, reorganización anatómica y cambios en el metabolismo en huevecillos y pupas; y finalmente cambios en el hábito alimenticio, madurez sexual y edad del adulto (Busvine, 1971). Champ y Dyte (1976) señalan que los estados de reposo metabólico, afectan la respuesta de los insectos al inóculo.

Busvine (1971) indica que la temperatura y humedad relativa tienen efecto sobre los resultados de bioensayo. Este autor menciona que la iluminación puede modificar el comportamiento del insecto, lo que puede influir en la sobrevivencia directamente al afectar la tasa metabólica, o bien influir indirectamente en los bioensayos en que el insecto incrementa la dosificación recibida al desplazarse sobre una superficie tratada. Con respecto a la dieta, el citado autor señala que la cantidad y calidad de esta puede afectar la capacidad de sobrevivencia del insecto; además de que puede existir una diferencia en la tolerancia entre individuos recién alimentados y aquellos que se han mantenido sin alimento por un tiempo (Tejeda y Navarro, 1994).

La elección de la respuesta a medir en un bioensayo es discrecional, tiene la única condición de que esté relacionada con la medición de la tolerancia al tóxico. Entre los criterios empleados podemos encontrar: muerte, ausencia de movimiento, "derribo" definido por Champ y Dyte (1976) como la incapacidad de ponerse de pie o caminar normalmente, cambio de peso, incapacidad de la larva de desplazarse una distancia equivalente a la longitud de su cuerpo (Magaro y Edelson, 1990), o respuestas tan exóticas como el hábito tejedor de las arañas o tan complejas como el comportamiento de larvas tratadas.

El tiempo que transcurre entre el inicio de la exposición o tratamiento, y la evaluación de la respuesta influye en el tipo y grado de esta última. La exposición al insecticida puede ser continua o puede estalecerse un período limitado de exposición

(Champ y Dyte, 1976). El tiempo de exposición depende del tipo de bioensayo y de las características de acción del bioinsecticida; por ejemplo, seis horas en ensayos de insecticidas convencionales con *Plutella xylostela* (Magaro y Edelson, 1990) o varias semanas en ensayos de huevecillos de curculionidos con hongos entomopatógenos (Magaro y Edelson, 1990).

A pesar de que no se han reportado bioensayos con *Tagosodes orizicolus* y delphácidos en general utilizando cepas de *Bt*, hay algunos reportes de bioensayos con *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y áfidos para probar resistencia y susceptibilidad de los insectos hacia insecticidas formulados. Por ejemplo, la FAO estableció un método para la detección de resistencia en ninfas de *Bemisia tabaci*, el procedimiento consiste en sumergir plantas de frijol en una solución insecticida (Busvine, 1980). Asimismo, Prabhaker *et al*, 1985 evaluaron la susceptibilidad de *Bemisia tabaci* a varios insecticidas confinándolas en plantas tratadas por inmersión. La FAO estableció en 1970 un método tópico para la determinación de resistencia de *Myzus persicae* (Aphididae), sin embargo el experimento se consideró muy laborioso y impráctico para usarse con especies pequeñas, por lo que para insectos dentro de la familia Aphididae la inmersión de hojas de la planta hospedera en soluciones insecticidas es el método más usado (Navarro y Tejeda, 1994). Por otra parte, a diferencia de los métodos de inmersión Davidson *et al* (2000) patentó un sistema de alimentación para la crianza de *Bemisia argentifolii*, el cual consiste en un sistema formado por un conjunto de platos unidos por prensas los cuáles atrapan en el medio una membrana porosa autoclavable a través de la cuál las ninfas recién eclosionadas se alimentan de una dieta basada en extracto de levadura y sacarosa.

REFERENCIAS

- Angus T. A. 1954. A bacterial toxin paralyzing silworm larvae. *Nature*, 173, 545-546.
- Aranda E. 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebrate Pathol.* 68:203-212.
- Arévalo K. 1996. Avances en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Aronson A. I., W. Beckman y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiol. Rev.* 50, 1-24.
- Aronson A.I., E.S.W. Han McGaughey, y D. Johnson. 1991. The solubility of inclusion protein from *Bacillus thuringiensis* is dependent upon protoxin composition and is a factor in toxicity to insects. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 981-986.
- Atkins J.G. 1966. Summary of Research of Hoja Blanca, and insect transmitted virus disease of rice in the Americas. FAQ-IRC Working Party on rice Production and Protection. Eleventh Meeting.
- Atkins J.G. y C.R. Adair. 1957. Recent Discovery of hoja blanca, a new rice disease in Florida and varietal resistance test in Cuba and Venezuela. *Plant Disease Reporter* 41: 915Pp.
- Atkins J.G. y H.A. Lamey. 1959. Hoja blanca disease of rice (Abstr.) *Phytopathology* 49:533.

- Atkins J.G., J.P. Kramer y D. Hensley. 1958. Hoja Blanca and its insect vector found on rice in a second area in the United States. United State Department of Agriculture. Plant Disease reporter 42: 1414.
- Bánki L. 1978. Bioassays of Pesticides in the laboratory; Research and Quality Control. Akademia Kiadó. Budapest, Hungary. 475Pp.
- Beebee T.J.C. y R.P.M. Bond. 1973. Effect of the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* on normal and ecdysone-stimulated ribonucleic acid polymerase activity in intact nuclei from the fat body of *Sarcophaga bullata* larvae. *Biochem. J.*, 136, 1-7.
- Bernal A. 1939. La situación patológica del arroz en el Valle del Cauca. Revista Facultad Nacional Agronomía Medellín, Colombia :234-238.
- Boucias D. G. y J. C. Pendland. 1998. Principles of insect pathology. Kluwer Academic Publishers, Norwell, Massachusetts.
- Bravo A., K. Hendrickx, S. Jansens y M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 237-246.
- Bravo A., S. Jansens y M. Peferoen. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebrate. Pathol.* 60: 237-246.
- Busvine J.R. 1971. A Critical Review of the Techniques for testing Insecticides. 2nd. Ed. Commonwealth Agricultural Boureaux. England. 345 Pp.

- Champ B.R. y C.E. Dyte. 1976. Informe de la Prospección Mundial de la FAO sobre la susceptibilidad a los insecticidas de las plagas de granos almacenados. Colección FAO: Producción y Protección Vegetal. No 5.
- Cralley E.M. 1957. Hoja Blanca-white leaf-a new disease of rice. Arkansas Farm Research, 6:9.
- Dávalos L.M.1997. Marcadores moleculares asociados a resistencia al virus de la hija blanca en arroz, (*Oryza sativa*) Trabajo de Grado. Universidad del Valle Cali. 97Pp.
- Distant W.L. 1912. Descriptions of a new genus and species of oriental Homoptera. Annals and Magazine of Natural History. 9: 181-194; 459-471.
- Dow A.T. 1986. Insect Midgut Function. Advances in Insect Physiology. Vol. 19.
- Dunn P.H. 1960. Control of house flies in bovine faeces by a feed additive containing *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. J. Insect. Pathology. 2:13-16.
- Edlund T., I. Siden y H. Boman, (1976). Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. Infect. Immun. 14: 934-941.
- Elías R. 1963. Hoja Blanca-uma séria doença do arroz. O Biológico 29:46-48.
- Estruch J. J., G. W. Warren, M.A. MullinsNye, G. J. Craig, y M. G. Koziel. 1996. Vip 3A, a novel *Bacillus thuringiensis* vegetative insecticide protein with a wide spectrum of activities against lepidopteran insects. *Proc. Nat. Acad. Sc. USA*, 93, 5389-5394.

- Everett T.R. y H.A. Lamey. 1969. Hoja Blanca. Pages 361-377 en: Viruses, Vectors, and Vegetation. K. Maramorosh, ed. Interscience, New York. 66Pp.
- Falk B.W., J.H. Tsai y S.A. Lommel 1987. Differences in detection of maize stripe virus capsid and major non-capsid proteins in planta and insect host. J. Gen. Virol. 68: 1801-1811.
- Faust R.M. y A. Lee Bulla. 1982. Bacteria and their toxins as insecticides in microbial and viral pesticides. Ed. Edouard Kurstaki, Marcel Dekker, Inc. New York. 3: 75-206.
- Gingery R.E., I.R. Nault y E.O. Braudfute 1981. Maíz stripe virus: Characteristics of a member of a new virus class. Virology 112: 99-108.
- Glare T. y M. Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley and Sons. UK. Pp 308.
- Guereca L. y Bravo A. 1998. The oligomeris state of *Bacillus thuringiensis* Cry toxins in solution. Biochimica et Biophysica Acta. 342-350.
- Hannay C. L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore forming. Nature, 172, 1004.
- Hannay, C. L. y P. Fitz-James. 1995. The protein crystals of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Canadian J. Microbiol. 1, 694-709.
- Hernández M.P. y A. Belloti. 1984. Ciclos de vida y hábitos de *Haplogonatopus hernandezae* Olmi (Hymenoptera: Dryinidae) controlador natural del saltahojas del arroz *Sogatodes orizicola* (Muir). Revista Colombiana de Entomología 10 No 3-4:3-8.

- Hernández N., N. Zamora y E. Arias. 1989. Comportamiento de las variedades de arroz resistentes al insecto *Sogatodes orizicola* en condiciones de producción. *Agrotecnia de Cuba* 21 (1): 37-49.
- Hofte H. y H. R. Whiteley. (1989). Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53:242-255.
- Honée G. and B. Visser 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Entomol. Exp. Appl.* 69: 145-155.
- Jarrett P. y M. Stephenson. (1990). Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1608-1614.
- Jennings P.R. y H.M. Beachell. 1960. Hoja blanca disease of rice found in Mexico. *Plant Disease Reporter*, 44:751.
- Knowles B. H. (1994). Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advan. Insect Physiol.* 24, 275-308.
- Knowles B.H. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Advances in insect Physiology*. Vol. 24.
- Lereclus D., A. Delecluse y M. M. Lecadet, 1993. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. *Bacillus thuringiensis*, an Environmental Biopesticide: Theory and Practice (eds. Entwistle, P. F., Cory, J. S., Bailey, M. J. y Higgs, S) John Wiley and Sons, Chichester UK, 37-70.
- Levinston B. L., K. J.Kasyan, S. S. Chiu, T. C. Currier, y J. M. Jr. González, 1990. Identification of beta-exotoxin production, plasmids encoding beta-exotoxin, and a

new exotoxin in *Bacillus thuringiensis* by using high performance liquid chromatography. *J. Bacteriol.*, 172, 3172-3179.

Li J., J Carroll y D.J. Ellar. (1991). Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5Å resolution. *Nature*, 353: 815-821.

Lobatón V. y G. Martínez. 1976. Algunas relaciones biológicas insecto-planta-patógeno en la enfermedad hoja blanca del arroz. *Noticias Fitopatológica (Colombia)* 5 (1): 29-37.

Lovgren A.; M.Y. Zhang, A.; G. Engstrom Dalhammar y R. Landén. (1990). Molecular characterization of immune inhibitor A, a secreted virulence protease from *Bacillus thuringiensis*. *Mol. Microbiol.* 4:2137-2146.

Madriz M.J.A. 1998. Tesis de Maestría. Caracterización Molecular del tenuivirus de la hoja blanca de *Echinochloa* (EHBV). Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, San José, Costa Rica.

Magaro J.J. y J.V. Edelson. 1990. Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). A technique for resistance monitoring in the Field. *J. Econ. Entomol.* 83 (4): 1201.

Mariani R. y A.M.M. Lenciov. 2001. *Tagosodes orizicolus* (Muir 1926), vector del virus de la hoja blanca del arroz en la República Argentina (Homoptera-Delphacidae). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata.* 104 (2).

Martin P. y R. Travers 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology.* 55: 2437-2442.

Mc. Milliam W.W. 1960. Hoja blanca disease or rice and its insect vector. *Rice Journal* 63 (13): 15-16.

- Meadows M. P. 1993. *Bacillus thuringiensis* in the environment, ecology and risk assessment, p. 193-220. En *Bacillus thuringiensis* an environmental biopesticide theory and practice. P. F. Entwistle, J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higgs (ed), Wiley, New York, N. Y.
- Mora R., A. Retana, y A.M. Espinoza 2001. External Morphology of *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae) revealed by Scanning Electron Microscopy. Entomological Society of America.
- Morales F.J. and A.L. Niessen 1985. Rice Hoja Blanca virus. Description of Plant viruses, No 229. Commonwealth Mycological Institute/association of Applied Biologist.
- Muir F. 1926. Contributions to our Knowledge of South America Fulgoroidea (Homoptera). Part 1. The Family Delphacidae. Series Bulletin No. 18, Honolulu. Pp 27.
- Muñoz C. y Espinoza A.M. 1998. Estudio de sobrevivencia de *Tagosodes orizicolus*, en tres especies silvestres del género *Oryza* (*O.latifolia*, *O. Glumaepatula* y *O. Rufipogon*) No publicado.
- O'Brien L.B. y S. Wilson 1985. Planthoppers Systematics and External Morphology. In: The Leafhoppers and Planthoppers. L.R. Nault y J.G. Rodríguez (Editores). John Wiley y Sons. 500p.
- Orellana P. 1981. Aspectos relacionados con la resistencia genética del arroz (*Oryza sativa*) al insecto *Sogatodes orizicola*, hoja blanca y *Pyricularia oryzae*. Agrotecnia de Cuba 13 (1).
- Pandelakis A.K. y J.D. Ellar 1994. Biochemical characterization of *Bacillus thuringiensis* cytolytic δ -endotoxins. Microbiology. 140, 1869-1880.

- Rodríguez C.P., R. Eugenio y S. Reyes 1996. Avances en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Sampson M.N. y G.W. Gooday. 1998. Involvement of chitinases of *Bacillus thuringiensis* during pathogenesis in insects. *Microbiology*. 144 (Pt 8):2189-94.
- Sangadala S., F.S Walters, L.H. English y M.J. Adang 1994. A mixture of *Manduca sexta* aminopeptidase and phosphatase enhances *Bacillus thuringiensis* insecticidal *CryIAC* toxin binding and 86Rb-K⁺ efflux in vitro. *J. Biol. Chem.* 269 (13): 10088-10092.
- Schieber E. y O.N. Sosa. 1960. Hoja Blanca disease of rice in Guatemala. *Plant Disease Reporter* 44:71.
- Schnepf E. y H. R. Whiteley (1981). Cloning and expression of *B. thuringiensis* crystal protein gene in *E. coli*. *Proc Natl Acad Sci. USA* 84:7036-7040.
- Schnepf H.E., N. Crickmore, J. Van Rie, J. Dereclus, 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.
- Showers W.B. y T.R. Everett. 1967. Transovarial acquisition of hoja blanca virus by the rice delphacid. *Journal of Economic Entomology* 60: 757-760.
- Smirnoff, W.A. 1977. Effect of chitinase on the action of *Bacillus thuringiensis*. *Can. Entomol.* 103: 1829-1831.
- Smith R. A. y G. A. Couche. (1991). The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311-315.

- Starnes R. L., C. L. Liu y P. G. Marrone. 1993. History, use, and future of microbial insecticides. *Amer. Entomol.*, 39, 83-91.
- Tejeda A. y Navarro M. 1994. El Bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. México.
- Thomas D., A.J. Morgan y J. Whipps 2000. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains in laboratory culture, soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 1, 118-124.
- Van Rie J. 2000. *Bacillus thuringiensis* and its use in transgenic insect control technologies. *Int. J. Med. Microbiol.* 290, 463-469.
- Wilson M. y M. Claridge 1991. Handbook for the identification of leafhoppers and planthoppers of rice. C.A.B. Wallingford Oxon, International Institute of Entomology (Natural Resources Institute), 142Pp.
- Wilson S.W., C. Mitter, R.F. Denno y M.R. Wilson 1994. Evolutionary patterns of host plant use by delphacid planthoppers and their relatives. In: *Planthoppers, their ecology and management*. Chapman and Hall. New York. London. 799 Pp.
- Zeigler R.S., A. Pantoja, M.C. Duque y G. Weber. 1994. Characteristics of resistance in rice to rice hoja blanca virus (RHBV) and its vector, *Tagosodes orizicolus*. Centro International de Agricultura Tropical (CIAT) A.A. 6713, Cali Colombia. *Ann. Apl. biol.* 1994. 124. 429-440.
- Zhang M.Y., A. Lövgren, M.G. Low, y R. Landén. (1993). Characterization of an avirulent pleiotropic mutant of the insect pathogen *Bacillus thuringiensis* : reduced expression of flagellin and phospholipases. *Infect. Immunol.* 61: 4947-4954.

CAPÍTULO 2
Characterization of a collection of *Bacillus thuringiensis* strains
isolated from homopteran insects from Costa Rican
agroecosystems

Rebeca Mora¹ and Ana M. Espinoza^{1,2}

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación,
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.

Characterization of a collection of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from homopteran insects from Costa Rican agroecosystems

Rebeca Mora¹ and Ana M. Espinoza^{1,2}

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica.

ABSTRACT

Numerous strains of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* are known to have a toxic effect on many insect larvae of the orders Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. However, very few reports exist that involve effective strains against homopterans. Based on the premise that there is a coevolution between the bacteria and the insect hosts, *Bt* strains have been isolated from homopteran insects, to test their effectiveness through bioassays against the plant hopper *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae), an important rice pest and vector of the rice hoja blanca virus. A collection of 44 *Bt* strains were obtained from live and dead homopterans from agroecosystems and nearby areas. This collection was evaluated through the crystal morphology, molecular weights of the δ -endotoxins and the genetic profiles of the *cry*, *cyt* and *vip* genes they contained. Most *Bt* isolates presented diverse patterns of the crystal morphology: 37 strains had pleomorphic crystals (80%), four strains presented a combination of pleomorphic, bipyramidal and oval crystals (9%), one showed pleomorphic and bipyramidal, another pleomorphic and oval and two strains showed oval and bipyramidal crystals. Furthermore, the analysis of the δ -endotoxins through SDS-PAGE showed very diverse electrophoretic patterns. Sixteen strains showed two main

polypeptides. The low molecular weight proteins fluctuated between 40 and 100 kDa whereas those with high molecular weight oscillated between 70 and 175 kDa. In contrast, 28 strains showed a single band in the SDS-PAGE gel, 12 of them had a 45 kDa protein and 16 had proteins of molecular weights from 60 to 175 kDa. As a result of the PCR analyses, 20 strains amplified with one or more *cry* genes (*cry1*, *cry3*, *cry7*, *cyt* and *vip3*), whereas 25 strains (60%) did not amplify with any of the primers tested. Furthermore, 14 presented two or more genes and four strains amplified with the primer for the *cry1* gene. No strains amplified with the primers for the genes *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1F*, *cry1E*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *vip1* and *vip2*. The high diversity of crystal morphology, electrophoretic patterns and the absence of amplification with several known *cry*, *cyt* and *vip* genes suggests that some of the strains could contain novel insecticidal proteins.

KEY WORDS

Bacillus thuringiensis, δ -endotoxins, *cry*, *vip*, *cyt* genes, crystal, *Tagosodes orizicolus*.

INTRODUCTION

Rice is one of the most important food sources in the diet of many developing countries. In Costa Rica, annual rice consumption is approximately 45 Kg per capita (Oficina Nacional de Semillas, 1991). The rice hoja blanca virus (RHBV) constitutes one of the main constraints in rice production, causing losses up to 80%, if the varieties used are highly susceptible to the virus (Orellana, 1981). The RHBV is transmitted in a circulative propagative fashion by the delphacid *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae). In addition, *T. orizicolus* is considered a rice pest since, while feeding and ovipositing, it causes severe damages to the rice plant.

One of the methods more commonly used for the control of the RHBV disease is the application of organophosphate insecticides to diminish the populations of *T.*

orizicolus. Depending on the insect population dynamics, as much as ten insecticide applications are performed during the crop cycle (Morales and Niessen, 1985). However, this control method is not very effective to control the virus since just few vectors are required to disseminate the virus in the field. In addition, once rice tillering has occurred, contact insecticides can no longer reach nymphs and females, due to the fact that the insects lodge mainly in the culm base, protected from insecticide applications. On the other hand, synthetic insecticides also present numerous inconveniences: broad insecticidal action affecting in turn beneficial insects, high toxicity to mammals and prolonged residual effect contaminating rivers and underground water.

The use of bioinsecticides based on the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) represents an alternative for the sustainable control of economically important insect pests (Schnepf *et al.*, 1998). These bioinsecticides are innocuous to mammals, have a short persistence and their spectrum of action is very specific. In addition, *Bt* is an important source of insecticidal genes that can be introduced in the crop genome by genetic engineering.

Bt forms parasporal crystalline inclusions that are composed of insecticidal proteins known as δ -endotoxins during the sporulation phase (Schnepf *et al.*, 1998). The difference in the toxicity of the *Bt* strains depends on the type of the δ -endotoxin they contain. Presently, more than 170 sequences of different δ -endotoxins are known, and based on sequence similarity, they constitute 28 different groups of Cry proteins (Schnepf *et al.*, 1998).

Because a coevolution between *Bt* strains and susceptible insects has been proposed (Apoyolo *et al.*, 1995), this research involves the isolation of *Bt* strains from live and dead homopterans, followed by their morphological and molecular characterization. This *Bt* collection will be later evaluated using a novel feeding bioassay system (Mora and Espinoza, 2003, in press) for their toxicity towards the delphacid *Tagosodes orizicolus*.

MATERIAL AND METHODS

Insect collection: Insects of the families Aphididae, Cicadellidae, Delphacidae, Membracidae and Aleyrodidae were collected in different agricultural ecosystems of Costa Rica. The insects were obtained from different host plants, such as rice, lettuce, broccoli, pepper, Luffa sponge (*Luffa cylindrical*), beans, and coffee, as well as from different nearby wild areas (Table 1). The search and collection of dead insects was centered in gregarious families where it is easier to detect dead insects. These families mainly included aphids and the white fly *Bemisia tabaci*, where the insects were collected manually or using a suction trap. In non-gregarious families both live and dead insects were collected using a motor suction pump (Craftzman 32 cc, USA, modified). The collected insects were later preserved at 4°C in Eppendorf® tubes with 70% ethanol.

Isolation of *Bacillus thuringiensis* strains: Homopteran insects were separated in dead and live groups and later they were classified according to family or species. Groups of 10 to 20 insects from a same family and collecting site were homogenized in LB (Luria Bertani, SIGMA) medium and incubated overnight at 30°C. The next day, samples were inoculated in Petri dishes with solid agar (Bacteriological Agar, SIGMA) medium and incubated at 30°C for 4-5 days. The isolation protocol by Travers *et al.* (1987) was also used.

Crystal microscopic analyses: The bacterial colonies that presented the typical colony morphology for *Bt* were individually inoculated in Petri dishes with solid agar medium. A sample of these purified strains was then collected, from approximately four-day-old cultures, and light microscopy observations were performed (Nikon eclipse E-200), using slides stained with crystal violet or Coomassie blue. For scanning electron microscopy, diluted suspensions of spore-crystal were placed on aluminium stubs and air-dried. Samples were coated with gold in a Fullam EMS-76M evaporator for 5 min, and examined and photographed with a Hitachi S-2360N at 10-15 kv and observed at magnifications between 2000 and 24000X.

Sample preservation: The sporulated *Bt* strains were frozen at -70°C in sterile glycerol (1 part glycerol and one part of LB medium). A loop of this culture was taken and resuspended in 100 µl sterile distilled water, and sterile filter paper strips were impregnated

with the suspension of spores and crystals. These were later air dried and stored at room temperature for long-term conservation.

Protein electrophoresis: The spore and crystal suspensions were analyzed in 10% polyacrylamide gels (SDS-PAGE). The molecular weight of the proteins was estimated using known molecular weight markers (BIORAD 161-0304).

PCR and product analysis: For DNA extraction, the protocol described by Chen and Kuo (1993) was used. DNA concentration was estimated by fluorometry (Quantech®, model FM1 109535). The primers used were those reported for the following gene families: *cry1* (*cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E* and *cry1F*), *cry3-cry7*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cyt* (Bravo *et al.*, 1998), *vip1*, *vip2* and *vip3* (Bravo, personal communication). For PCR analysis, the following reaction mixture was used: 25mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 20μM primers and 2,5 U *Taq* polymerase in a total volume of 25 μL. Four microliters of sample DNA (10ng/ul) were also used. The amplification program consisted of the following conditions: a denaturing step of 2 min. at 95°C, followed by 30 cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 72°C and 1 minute at 72°C, and a final extension step at 72°C for 5 minutes. The PCR products were analyzed in 1% agarose gels.

RESULTS

In a preliminary experiment to compare the isolation protocol of Travers and collaborators (1987) with the one described in Materials and Methods, 2% *Bt* recovery was obtained using the Travers procedure, whereas 30% was obtained using the second protocol. Both experiments were done from a total of 15 samples of insects belonging to the homopteran families Cicadellidae and Delphacidae. Approximately 1300 insects from different families of the order Homoptera were collected. *Bacillus thuringiensis* was isolated from 44 (40%) out of 120 insect groups using the isolation protocol of Travers and collaborators (1987).

The microscopic analysis of *Bt* strains showed high diversity in crystal morphology as well as in crystal size (Table. 1). Thirty seven strains showed pleomorphic

crystals (80%), four a combination of pleomorphic, bipyramidal and oval crystals (9%), one pleomorphic and bipyramidal, another pleomorphic and oval, whereas two strains presented oval and bipyramidal crystals (Fig.1). Crystal diversity was confirmed using scanning electron microscopy, showing that some strains presented among others, bipyramidal, oval and pleomorphic crystals (Fig.2).

The SDS-PAGE analyses of the δ -endotoxins showed diverse electrophoretic patterns. Sixteen strains showed two main polypeptides: The proteins with lower molecular weights fluctuated between 40 and 60 KDa, whereas those with high molecular weights oscillated between 70 and 175 Kda. In addition, 28 strains showed a single band, 12 of which presented a protein 45 KDa and the remaining 16 strains had one band with molecular weights between 60 and 175 KDa (Table. 1).

As a result of the PCR analyses, 23 strains did not amplify with any of the primers used, whereas 20 amplified with one or more primers for the *cry1*, *cry3*, *cry7*, *cyt* and *vip3* genes (Table 1). The collection presented 8 different genetic profiles (Table. 2). It was also observed that 14 strains amplified with primers for two or more genes, whereas six strains amplified with one gene. Only four strains amplified with the *cry1* gene: these were also analyzed with specific primers for the genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E* and *cry1F*, of which amplification was observed only with the primers corresponding to *cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac*. Of four strains that amplified with *cry1Aa*, two of these also amplified with the *cry1Ab* and *cry1Ac* genes, and one strain amplified with both *cry1Ac* and *vip3*. No strains contained the *cry1Ad*, *cry1B*, *cry1C*, *cry1D*, *cry1E*, *cry1F*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *vip1* and *vip2* genes.

DISCUSSION

A collection of forty-two *Bacillus thuringiensis* strains was obtained. These were isolated from live and dead insects of the order Homoptera from different ecosystems and

crops that were not subjected to insecticide applications, with an efficiency of *Bt* isolation of 40%. This efficiency was inferior to the isolation percentages reported for environmental samples, such as soil, foliage or fallen leaves (50-60%) (Personal communication, G. Arrieta). The sampling method used was directed toward the isolation of *Bt* strains from homopterans, in hope that some of the insects were infected with *Bt* strains. However, not all *Bt* strains isolated are pathogenic to homopterans, since spores could be externally carried in the exoskeleton of the insect.

A lower *Bt* isolation efficiency was obtained with the isolation protocol of Travers and collaborators (1987) (2%) compared with the one described in Materials and Methods (40%). This result could be due to the many selective steps of the Travers protocol that includes acetate-LB medium that inhibits *Bacillus* spp. spore germination) and T3 medium that promotes *Bacillus* spp. spore germination. These selective steps apparently do not facilitate the recovery of the bacteria that were present in the samples collected, and instead, the loss of some *Bt* strains may have happened during this procedure.

Although homopterans were collected from organic farms or neighboring agricultural areas, with less insect diversity than in protected ecosystems, a high variation was observed in *Bt* crystal morphology, molecular weights of the δ -endotoxins and in the genes they contained. This represents a promising condition in the search for specific strains for different species of insects.

One particularity of this collection is that the most abundant crystal was pleomorphic and not bipyramidal, as reported for other *Bt* collections (Viquez, 2000, Bravo *et al.*, 1998). Furthermore, *cryI* genes associated with bipyramidal crystals in the literature (Shneft *et al.*, 1998) were not frequent in this collection. In addition, the presence of pleomorphic crystals has been mainly related to the toxic effect against Diptera and Coleoptera (Shneft *et al.*, 1998). Therefore, it is important to determine if these strains have toxic effects against other insect orders such as Homoptera.

The abundance of pleomorphic crystals, as well as the diversity observed in the molecular weights of the δ -endotoxins of the strains from this collection contrasts with the prevalence of bipyramidal crystals and homogeneity of the molecular weights of the δ -endotoxins of *Bt* strains isolated from other agroecosystems (Viquez, 2000). It is possible that this difference is due to the fact that the sampling sites in this case were organic farms with a higher insect diversity than those exposed to frequent synthetic insecticide applications, in which insect diversity is lower.

Regarding the detection of one or two polypeptides, when the δ -endotoxins of the strains from the collection were analyzed in SDS-PAGE gels, it is important to remember that the presence of a single protein in the gel represents either the protoxin or activated toxin, whereas two bands correspond to the precursor and product in the same sample.

The 25 strains that did not amplify with the primers tested represent a promising sample for the search for novel δ -endotoxins for the control of homopterans or other insect orders of economic importance since of all them showed bands when analyzed by SDS-PAGE. These strains could contain other cry genes that have already been described previously, but that were not analyzed in this research. In addition, this collection presented strains with *vip3* genes that would be interesting to test in bioassays involving Homoptera. It is important to stress that in broad bioassays using a subsample of the collection of *Bt* strains described in this research, six exhibited a toxic effect on *T. orizicolus*, when tested with a novel bioassay for this species (Mora y Espinoza, 2003).

Thus, the discovery of toxic *Bt* strains for *Tagosodes orizicolus* is highly important, because it opens the possibility of conducting basic studies that could help understand the interaction of the *Bt* δ -endotoxins with the gut of phloem-feeding insects. It would also provide an environmental-friendly alternative for the control of agronomically important pests. In addition, the δ -endotoxins of these strains could also be a valuable source for the formulation of bioinsecticides and for obtaining genes that could be used in plant genetic transformation.

REFERENCES

- Apoyolo C.I., Drif L., Vassal J.M., Debarjac H., Bossy J.P., Leclant F. y Frutos R. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth, *Homoeosoma nebulella*. *Appl Environ Microbiol* 61:4343-4347.
- Atkins J.G. and Adair R.C. 1957. Recent discovery of hoja blanca, a new rice disease in Florida and varietal resistance tests in Cuba and Venezuela. *Plant Disease Reporter* 41: 911-915.
- Bravo A., Sarabia S., López L., Ontiveros H., Abarca C., Ortiz A., Ortiz M., Lina L., Villalobos J., Peoa G., Noez V., Soberón M. y Quintero R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and environmental Microbiology* 64:4965-4972.
- Chen W. and Kuo T. 1993. A simple and rapid method for the preparation of gram negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*. 21: 2260.
- Mora R. and Espinoza A.M. 2003. A novel bioassay procedure to evaluate *per os* toxicity on the rice delphacid, *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Homoptera:Delphacidae). In press.
- Morales F.J., Niessen A.I. 1985. Rice hoja blanca virus. Description of plant viruses, N 299. Commonwealth Mycological Institute/Association of Applied Biologists.
- Oficina Nacional de Semillas. 1991. Memoria. San José, Costa Rica.

- Orellana P. 1981. Aspectos relacionados con la resistencia genética del arroz (*Oryza sativa*) al insecto *Sogatodes orizicola*, hoja blanca y *Piricularia oryzae*. *Agrotecnia de Cuba*. 13 (1) Pp 37-45.
- Shnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus, D. Baum, Feitelson J., Zeigler D.R. and Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. P. 775-806.
- Travers R.S., Paw M., Reichelderfer C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ Microbiol.* 53: 1263-1266.
- Viquez A. 2000. Búsqueda y caracterización de proteínas biopesticidas novedosas a partir de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de ecosistemas costarricenses. Thesis School of Microbiology, Universidad de Costa Rica.
- Zeigler R. S., Pantoja A., Duque, M.C., Weber, G. 1994. Characteristics of resistance in rice hoja blanca virus (RHBV) and its vector, *Tagosodes orizicolus* (Muir). *Annals of Applied Biology* 124:42.

LEGENDS TO FIGURE

Table. 1 Crystal morphology, molecular weights of the δ -endotoxins and genetic profile of a collection of forty-four strains of *Bacillus thuringiensis* isolated from homopterans in Costa Rican agroecosystems.

Table. 2 Genetic profile of forty-four *Bacillus thuringiensis* strains.

Figure. 1 Diversity in the crystal morphology of forty-four *Bacillus thuringiensis* strains.

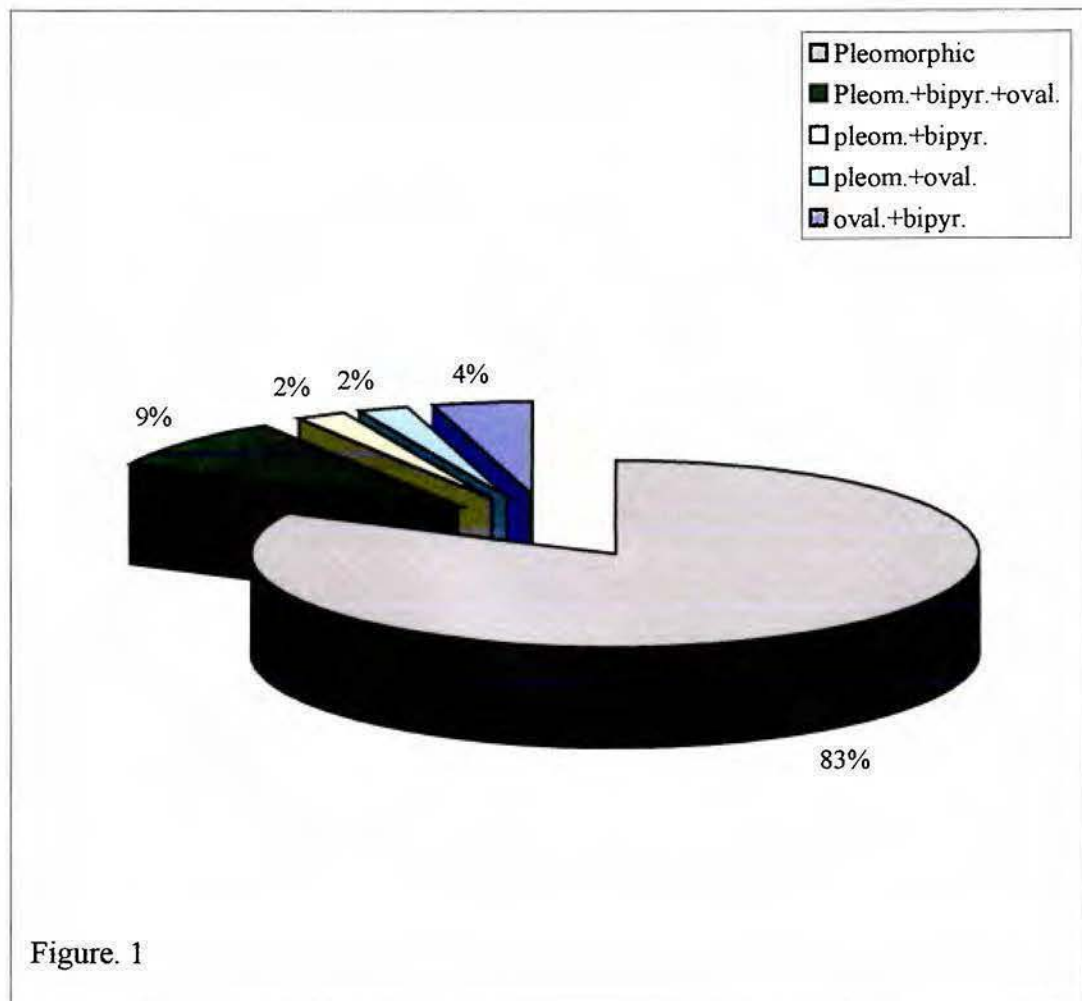
Figure. 2 Scanning electron micrographs of crystals of *Bacillus thuringiensis* strains A. Strain 40-X-m with crystals of pleomorphic and oval morphology (bar=1.76 μ m) B. Strain 40-X-m with different types of crystal morphology (bar=1.50 μ m): pleomorphic, oval, bipyramidal. C. Strain 8-S-mb with oval crystal morphology (bar=1.50 μ m)

Code	Molec. weight (kDa)	Crystal morphology	Genetic profile
1-O-to	45	Pleomorphic	Did not amplify
2-F-d	45	Pleomorphic and bipyramidal	Did not amplify
3-G-c	45	Pleomorphic	Did not amplify
4-I-To	45	Pleomorphic	<i>cry 3 y cry 7</i>
5-X-m	45	Pleomorphic	<i>cry 1Aa, cry1Ac, vip3</i>
6-Ao-c	45	Pleomorphic	Did not amplify
7-Ao-a	45	Pleomorphic	Did not amplify
8-S-mb	150	Pleomorphic	Did not amplify
9-F-m	45	Pleomorphic	Did not amplify
10-F-c	45	Pleomorphic	<i>vip 3</i>
11-S-d	45	Pleomorphic	Did not amplify
12-F-c	45	Pleomorphic	Did not amplify
13-F-c	58	Pleomorphic	Did not amplify
14-F-c	79	Pleomorphic	<i>vip 3</i>
15-P-To	86	Pleomorphic	Did not amplify
16-O-to	95	Pleomorphic	<i>cry 3 y cry 7</i>
17-S-d	83	Pleomorphic	Did not amplify
18-F-c	101	Pleomorphic	<i>cyt</i>
19-F-c	108	Pleomorphic	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1Ac</i>
20-F-c	142	Pleomorphic	Did not amplify
21-X-m	142	Pleomorphic	<i>cry1Aa, cry1Ac, cry1Ab</i>
22-X-m	146	Pleomorphic and oval	<i>cyt, vips (vip3)</i>
23-O-To	150	Pleomorphic, oval and bipyramidal	Did not amplify
24-P-To	150	Pleomorphic	<i>cyt, vips (vip 3)</i>
25-O-d	150	Pleomorphic, oval and bipyramidal	<i>cyt</i>
26-O-to	176	Pleomorphic	<i>cyt, vips (vip3)</i>
27-S-mb	176	Pleomorphic	<i>vip 3</i>
28-F-c	176	Pleomorphic	Did not amplify
29-F-c	47, 70	Pleomorphic	Did not amplify
30-S-d	83, 64	Pleomorphic	Did not amplify
31-F-m	84, 40	Pleomorphic	<i>cyt</i>
32-F-d	85, 75	Pleomorphic	Did not amplify
33-O-to	93, 58	Rhomboid and oval	<i>cry 3 y cry7</i>
34-S-d	92, 64	Pleomorphic	<i>cry 3 y cry 7, vips (vip 3)</i>
35-X-m	103, 98	Pleomorphic	Did not amplify
36-G-e	112, 104	Pleomorphic	Did not amplify
37-X-m	115, 95	Pleomorphic	<i>cry 3 y cry 7, cyt, vips (vip3)</i>
38-O-to	119, 86	Pleomorphic	Did not amplify
39-G-mb	131, 64	Pleomorphic	Did not amplify
40-X-m	134, 84	Pleomorphic, oval and bipyramidal	<i>cry1Aa, cry1Ab, cry1ac</i>
41-Ao-a	139, 107	Pleomorphic	<i>cyt, vips (vip 3)</i>
42-Ao-a	139, 113	Pleomorphic and oval	Did not amplify
43-S-d	176, 95	Pleomorphic	Did not amplify
44-O-to	176, 116	Pleomorphic and oval	<i>cyt, vips (vip 3)</i>

Table. 1

Number of Strains	Genetic profile
1	<i>cry3, cry7, cyt, vip 3</i>
1	<i>cry3, cry7, vip3</i>
1	<i>cryIAa, cryIAc, vip3</i>
3	<i>cryIAa, cryIAb, cryIAc</i>
3	<i>cry3, cry7</i>
5	<i>cyt, vip3</i>
3	<i>cyt</i>
3	<i>vip3</i>
23	Did not amplify

Table. 2



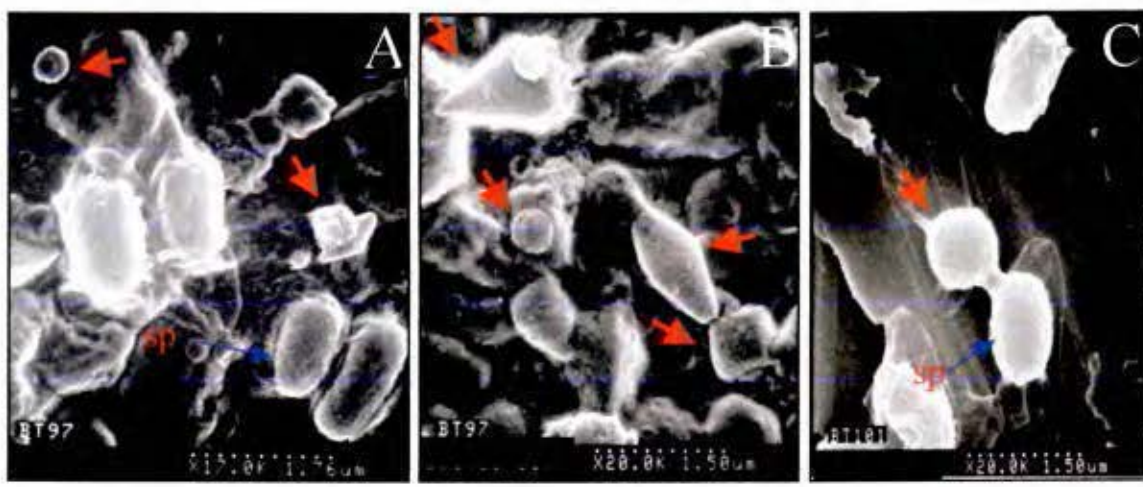


Figure. 2

CAPITULO 3

Análisis del modo de acción de la δ -endotoxina GP3 de *Bacillus thuringiensis* en tejidos del intestino de *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae) (Muir)

Rebeca Mora¹, Ana M. Espinoza^{1,2}, Jorge Sánchez³ y Alejandra Bravo³

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

³Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.

Análisis del modo de acción de la δ -endotoxina GP3 de *Bacillus thuringiensis* en tejidos del intestino de *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae) (Muir)

Rebeca Mora¹, Ana M. Espinoza^{1,2}, Jorge Sánchez³ y Alejandra Bravo³

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

³Instituto de Biotecnología de la UNAM, México.

RESUMEN

La mayoría de estudios de unión *in vitro* de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* se han realizado en tejidos del tracto intestinal de larvas del orden Lepidoptera. Estas larvas presentan intestinos relativamente grandes y fáciles de manipular, asimismo la mayoría de δ -endotoxinas descritas son específicas para larvas de este orden. En contraste, existen muy pocos reportes de δ -endotoxinas con especificidad para insectos chupadores pequeños pertenecientes al orden Homoptera. Esta investigación, pretende analizar mediante el uso de técnicas inmunohistoquímicas, la unión *in vitro* de la δ -endotoxina GP3 de *Bt* efectiva para el control de mosca blanca (*Bemisia tabaci*) (Homoptera:Aleyrodidae) a las microvellosidades apicales del epitelio intestinal medio de *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae). La metodología que se utilizó en el análisis de la unión *in vitro* de las ICPs (proteínas insecticidas del cristal), se estandarizó preliminarmente en intestinos de *Manduca sexta* (Lepidoptera:Sphingidae) utilizando la δ -endotoxina CryIAb y posteriormente se realizaron los ensayos de unión de la δ -endotoxina GP3 al epitelio intestinal de *T. orizicolus*. Se utilizaron anticuerpos específicos contra la

proteína CryIAb no biotinada (en el caso de *M. sexta*) y streptavidina-peroxidasa para la GP3 (en el caso de *T. orizicolus*). Observaciones mediante el microscopio de luz mostraron que en un 40% de los casos, se observó una unión leve de la toxina GP3 en el epitelio de las células intestinales de *Tagosodes orizicolus*. Los resultados obtenidos demuestran una interacción positiva de la toxina GP3 con el epitelio intestinal de *T. orizicolus*.

DESCRIPTORES

Bacillus thuringiensis (Bt), δ -endotoxinas, inmunohistoquímica, ensayos de unión, Homoptera, *Tagosodes orizicolus*, *Bemisia tabaci*

INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis (Bt) pertenece al grupo de bacterias Gram positivas. Esta bacteria tiene como característica sobresaliente la formación de inclusiones cristalinas compuestas de proteínas insecticidas conocidas como δ -endotoxinas durante la fase de esporulación (Schnepf *et al.*, 1998). La actividad insecticida que caracteriza estos cristales conllevó al desarrollo de bioinsecticidas basados en *Bt* para el control de ciertas plagas de importancia en la agricultura (Honée and Visser, 1993).

El modo de acción de las δ -endotoxinas en especies susceptibles dentro del orden Lepidoptera es el siguiente: los cristales proteicos son ingeridos por las larvas del insecto, posteriormente, son solubilizados en el intestino medio. Aquí, las proteasas transforman los monómeros de protoxina en toxina activa. La toxina activa se une a receptores en las microvellosidades apicales de las células epiteliales intestinales para posteriormente insertarse en la membrana celular y formar canales iónicos. Estos canales permiten el flujo libre de líquido y iones; lo que constituye finalmente, la causa de la muerte del insecto (Guy Honée y Bert Visser, 1993, Knowles, 1994).

Es importante resaltar que la unión de la toxina a su receptor es un evento complejo y bifásico: primero, la unión inicial de acercamiento de la δ -endotoxina a la membrana de la célula epitelial intestinal (unión reversible) y un paso posterior donde la molécula de la toxina, por medio de uno o más dominios específicos, se integra o inserta en la matriz membranal (unión irreversible) para formar un poro o canal iónico (Masson *et al.*, 1995). Asimismo, se ha comprobado que la toxicidad propiamente está determinada por la unión irreversible de la toxina, es decir la eficiencia con la cual se inserta en la membrana y pueda formar canales iónicos.

Debido a que la unión de las δ -endotoxinas de *Bt* a receptores específicos juega un papel muy importante en el modo de acción de estas proteínas, se ha demostrado la unión de las δ -endotoxinas a sus receptores en experimentos *in vitro* e *in vivo* en el tejido intestinal de insectos (Bravo *et al.* 1992 a y b, Hofmann *et al.* 1988 a y b, Bauer y Pankratz, 1992). Estos experimentos emplean métodos inmunocitoquímicos en los cuales se observa al microscopio de luz la unión de las δ -endotoxinas a la membrana peritrófica y a las microvellosidades apicales de las células epiteliales del intestino medio de insectos susceptibles.

La mayoría de cepas de *Bt* descritas son activas contra lepidópteros. Sin embargo, algunas cepas son tóxicas a coleópteros y dípteros. Más recientemente, se ha informado de cepas activas contra otros órdenes como: Hymenoptera, Orthoptera, Homoptera y Mallophaga (Schnepf *et al.*, 1998). Asimismo, la mayoría de los ensayos de unión *in vitro* y los posteriores efectos histopatológicos de las δ -endotoxinas de *Bt* se han descrito detalladamente para especies como *Manduca sexta*, *Plutella xylostella*, *Leptinotarsa decemlineata*, *Bombyx mori*, *Heliothis virescens* (Bravo *et al.*, 1992a y 1992b, Endo y Nshitsutsuji-Uwo 1980), la mayoría, especies pertenecientes al orden Lepidoptera. Sin embargo, dentro del orden Homoptera existen pocos reportes de δ -endotoxinas tóxicas (*Rhopalosiphum maidis* susceptible a una delta-endotoxina Cry, (Aranda, 1996) y un aislamiento de *Bt* con toxicidad para insectos de la familia Aphididae (Payne y Cannon, 1993) por lo tanto, se han realizado pocos estudios de unión *in vitro*. Este orden, se caracteriza por incluir insectos chupadores pequeños, de gran importancia como insectos

plaga y vectores de virus. Entre ellos *Tagosodes orizicolus* (Familia: Delphacidae), plaga del arroz y vector del virus de la hoja blanca.

La cepa GP3, aislada a partir mosca blanca muerta presenta toxicidad para *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) y presenta los genes cryIAa, cryIAb, cryIAc y cryIAd. Debido a que la cepa GP3 presenta una fuerte actividad tóxica en *Bemisia tabaci*, se espera que esta toxina interaccione con los receptores específicos en el intestino de mosca blanca, tal y como se ha descrito para otros insectos. Asimismo, dado que *B. tabaci* es un homóptero al igual que *T. orizicolus* se propone que la toxina GP3 puede ser también activa contra *T. orizicolus*. El objetivo de esta investigación es analizar mediante técnicas inmunohistoquímicas la posible unión *in vitro* de la toxina GP3 a las microvellosidades del epitelio intestinal de *Tagosodes orizicolus*.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de insectos *Manduca sexta* fue criada en el laboratorio de la Dra. Bravo usando una dieta sustituta. Las larvas utilizadas para realizar las disecciones fueron del quinto estadio. Adultos y ninfas de *T. orizicolus*, se obtuvieron de las colonias preestablecidas en el insectario del CIBCM.

Cepas de *B. thuringiensis* Las cepas GP3 y CryIAb son propiedad del laboratorio de la Dra. Bravo, en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, Cuernavaca. Las cepas 40-X-m y 5-X-m pertenecen al CIBCM y ambas fueron aisladas a partir de insectos del orden Membracidae muertos. Estas cepas se inocularon en platos con agar y se incubaron por aproximadamente cuatro días a 30°C.

Microscopía de los cristales Se realizaron observaciones al microscopio de luz con láminas teñidas con cristal violeta o azul Coomasie, a partir de cultivos de aproximadamente cinco días. También se realizaron observaciones al fresco de cultivos de 24 a 48 horas, utilizando un microscopio de contraste de fases.

Electroforesis de proteínas Se tomó una asada densa de una colonia de alrededor de 5 días y se resuspendió en 50 ul de tampón (10mM Tris-HCl, pH 7,2 y 5mM EDTA, pH 7,2). Las

muestras se agitaron en Vortex, tomándose 7,5 ul de muestra y adicionándose a 7,5 ul de tampón muestra (1M Tris-HCl, 2% SDS, 20% glicerol, 5% mercaptoetanol y azul de bromofenol). La mezcla se calentó por tres minutos en un baño de agua hirviendo. Las proteínas se analizaron en geles de SDS-PAGE al 10%, a 100 voltios por 3 horas. Los geles se tiñeron con azul de Coomassie y el peso molecular de las proteínas se estimó utilizando marcadores de peso molecular conocido (marcador de bajo peso molecular 77-14 kDa y marcador de alto peso molecular 200-45 kDa, BIO-RAD).

Purificación de los cristales La cepa se creció en medio de cultivo SP (cual) hasta la esporulación. Posteriormente se recuperó el cultivo y se lavó con 0,3M NaCl y 0.1 M EDTA, pH 8. Se centrifugó 3 veces a 10.000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. Seguidamente se resuspendió y se lavó el precipitado en agua con 1mM PMSF tres veces, centrifugando bajo las mismas condiciones. El precipitado resultante se resuspendió en un tampón TTN (20 mM Tris-HCl, 300mM NaCl y 1% Tritón X-100, pH 7.2). Se agitó en Vortex y se sonicó (3 pulsos de 50 seg. a 20 watts por 1 min. de descanso) para después colocar la muestra en un gradiente de sacarosa (84%, 79%, 72%, 67%). Para preparar los gradientes se agregó a cada una de las concentraciones, 400 µl de 1%Tritón, 2 ml de 1M Tris-HCl, pH 8 y 80µl de 5M NaCl. Se centrifugó a 23000 rpm por 20 min a 16°C y se colectaron las bandas que se observaron. Para eliminar la sacarosa, las fracciones se lavaron con agua bidestilada y 0.1% Tritón y se centrifugaron 3 veces a 10000 rpm por 10 min. Finalmente, se resuspendió el precipitado en 50mM Tris-HCl, pH 8 o agua con 1mM PMSF y se conservaron a 4°C.

Solubilización y tripsinización Los cristales purificados en agua se precipitaron por centrifugación por 10 min a 10000 rpm. La solubilización se realizó utilizando dos metodologías: la primera utilizando tampón de carbonatos. Se agregó a cada banda del gradiente, tampón carbonatos (solución A: 0,5 M carbonato de sodio y solución B: 0,5 M bicarbonato de sodio), se disolvió la solución B en 50 ml de agua y luego se agregó la solución A hasta llegar a un pH de 10,2. Se aforó a 100 ml y se diluyó 5 veces en agua con 0.2% mercaptoetanol y se incubó a 37 °C por 2 horas en agitación suave). Posteriormente, se centrifugó a 10000 rpm por 10 min y se tomó el sobrenadante para determinar la concentración de la proteína mediante el método de Bradford. Seguidamente, se agregó tripsina en una relación 1:50 y se incubó por dos horas a 37 °C (antes de tripsinar, se ajustó

el pH a 8.05 utilizando 50mM Tris-HCl). Se agregó PMSF y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min, para posteriormente guardar el precipitado en agua destilada. La segunda metodología utilizó tampón CAPS: se resuspendió la banda en 500 μ l de tampón, se agregó tripsina en una relación de 1:20 y se incubó a 20 °C por toda la noche. Posteriormente, la tripsina se inactivó con 1mM PMSF, se centrifugó por 10 min. a 10000 rpm y se recuperó el sobrenadante, analizándose en geles de SDS-PAGE al 10%.

Determinación de la concentración de proteína La determinación de la concentración proteica se hizo mediante el método de Bradford. Este método determina la concentración de las proteínas en solución y depende de el cambio en la absorbancia en el azul de Coomassie al unirse con la proteína. Se preparó una curva de calibración con suero de albúmina bovino (BSA) sobre la cual se determinó la concentración proteica de la incógnita. Se tomaron 0, 25, 50, 200 μ l de (BSA) y se les agregó un determinado volumen de la muestra de interés, finalmente se agregó 40 μ l de reactivo de Bradford y agua hasta llegar a un volumen final de 1000 μ l. Se determinó la absorbancia a 595 nm.

Marcaje de las δ -endotoxinas con biotina El marcaje de las δ -endotoxinas purificadas se hizo con éster de biotina (20 μ l de biotina en 0,6 mg/ml de toxina) incubando por una hora a temperatura ambiente. Con el objeto de remover el exceso de biotina, se pasó la mezcla toxina-biotina por una columna Sephadex G-25 previamente equilibrada con 20 ml de tampón fosfatos (solución 1: 0,01 M NaH₂PO₄ y 0.145 M NaCl y solución 2: 0.005 M Na₂HPO₄ y 0.145 M NaCl). Posteriormente, se agrega PBS para lavar la columna. A la columna equilibrada se aplicaron 200 μ l de la mezcla toxina-biotina y finalmente se colectaron todas las fracciones para determinar luego la concentración de proteína por el método de Bradford. Posteriormente se analizaron los resultados por Western Blot usando anticuerpos específicos o streptavidina-peroxidasa conjugada revelada con luminol.

Disección de intestinos Se colocaron adultos y las ninfas de *Tagosodes orizicolus* en una pequeña base y se embebió cada uno en una gota de alcohol al 70%. Bajo el esteréoscopio y utilizando pinzas finas se disectó el intestino manipulándolo lo menos posible y rápidamente. Esto con el fin de evitar provocar daño al tejido intestinal y la entrada de aire en la cavidad intestinal.

Preparación de los cortes Los intestinos se fijaron en Bouin Hollande (para 100 ml de solución de fijador: 2.5g acetato cúprico, 4g ácido pícrico, 10 ml formaldehído al 40% y

solución saturada de HgCl_2 al 10%) por 30 min a temperatura ambiente para después transferirlo a otro cambio de fijador donde permaneció por 24 horas. Posteriormente, el tejido se enjuagó rápidamente tres o cuatro veces con agua para luego dejarlo 12 horas en agua destilada. El tejido se conservó en etanol al 70%. Para infiltrar el tejido en parafina histológica, se deshidrató de la siguiente manera: 1h en etanol al 70%, 1h en etanol al 96% y dos veces 2h en etanol al 100%. La infiltración del tejido se inició con una mezcla de xileno/ etanol, 50/50 (v/v) por 1 h, 1h en xileno al 100%, 12 h a 58°C en xileno/Paraplast, 50/50 (v/v) y dos cambios de 24h en Paraplast 100%. Finalmente el tejido se embebió en Paraplast 100% y se endureció rápidamente en hielo. Se realizaron cortes histológicos de 5 micrómetros de grosor cortados con un micrótomo. Posteriormente se adhirieron a portaobjetos previamente impregnados de una solución de albúmina 1:10 (10 ml agua destilada, 5 ml de glicerina y 5 g de ovoalbúmina). Posteriormente, los cortes se estiraron sobre una plancha caliente a 40°C y se secaron durante 72h en una estufa a 40°C. Los cortes histológicos se desparafinaron e hidrataron (dos veces 5 min en xileno 100%, tres veces 5 min en etanol 100% y una vez 2 min. en agua destilada). El HgCl_2 (contenido en el fijador) se eliminó incubando los tejidos dos veces en solución de lugol (0,5% I_2 y 1%KI) por 3 minutos, y una vez por tres minutos en 5% tiosulfato de sodio. Los tejidos se lavaron una vez 3 min. en agua destilada y se equilibraron durante 5 min en tampon BTST (10mM Tris-HCl pH 7.6, 150mM NaCl, y 0.1% Tritón X-100).

Localización inmunocitoquímica de las toxinas Cada laminilla con tejido se cubrió con 0.35 ml de solución de las toxinas y se incubó por una hora a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Después de 1 h se lavó con BTST. Los cortes con toxina no biotinada se incubaron toda la noche con 0.35 ml de anticuerpo primario diluido 1:1000 con BTST y los cortes con toxina biotinada se incubaron con streptavidina diluida 1:100 con BTST. Posteriormente se lavó con BTST y se incubó por una hora con un anticuerpo secundario antiratón de conejo acoplado a peroxidasa (únicamente los portaobjetos con toxina no biotinada) diluido 1:200 en BTST. Posteriormente se lavó el exceso en ambos tratamientos durante un minuto con BTST. Seguidamente, se reveló (10-15min) la peroxidasa con una solución de diaminobencidina (25 mg en 200 ml de 0.5 M Tris HCl, pH 7.6) con 0.03 % de H_2O_2 . Finalmente los cortes se deshidrataron, clarificaron y posteriormente se sellaron usando resina Entellán como medio de montaje.

RESULTADOS

Se observó que ambas cepas 40-X-m y 5-X-m (Cuadro.1) contenían dos tipos de cristales: ovalados pequeños y bipiramidales grandes. Debido a la semejanza de los cristales, ambas cepas presentaron el mismo patrón de separación en los gradientes de sacarosa (Fig.1). Es importante tomar en cuenta que dependiendo de la forma y el tamaño del cristal variará la fracción del gradiente en donde se ubique, así como el tiempo requerido para su separación por ultracentrifugación.

Como resultado de la solubilización utilizando el tampón carbonatos de las fracciones de los gradientes correspondientes a las cepas anteriormente mencionadas se observa en la Fig.2 una buena solubilización de la segunda banda de los gradientes correspondiente a los cristales bipiramidales grandes (carril 3). En los carriles # 6,7,8,9 se observa que la pastilla arrastró poca proteína lo que indica una adecuada solubilización de los cristales. Sin embargo, en la Fig.3 que muestra el resultado de la solubilización utilizando el tampón CAPS se observa mucha proteína no solubilizada en los carriles # 6,7,8,9. Al igual que en el gel anterior, hay una adecuada solubilización de los cristales bipiramidales grandes. En las mismas figuras. 2 y 3 la tripsinización de las proteínas dió como resultado productos diferentes, vemos como en la Fig. 2, en los carriles #2 y 3 se muestra la solubilización en buffer carbonatos de los cristales ovalados y bipiramidales respectivamente de la cepa 40-X-M y en los carriles # 4 y 5 se muestra lo mismo para los cristales de la cepa 5-X-m. Ambas cepas dieron un resultado semejante en cuanto que los cristales bipiramidales mostraron una solubilización muy efectiva de una proteína de 65 Kda y los cristales ovalados presentaron una solubilización muy pobre bajo las mismas condiciones. Sin embargo se puede observar que en ambas cepas los cristales ovalados presentan una proteína de 63 Kda. Posteriormente, se intentó solubilizar las cepas en tampón CAPS con la finalidad de buscar una condición mejor en donde también se solubilizaran los cristales ovalados. En la Fig.3 se puede observar que la solubilización de ambos tipos de cristales de las dos cepas fue menos eficiente en este tampón. En estas condiciones, es evidente que el cristal bipiramidal se resuelve en dos bandas de peso

molecular muy cercano (65 y 60 Kda). La segunda banda de 60 Kda podría ser un producto de degradación de la primera banda ya que las cepas de Bt producen una gran cantidad de proteasas durante la esporulación y también debido a que este cristal está formado por una sola banda que corresponde a la de mayor peso observada al solubilizar con buffer carbonatos (Fig.2). Posterior a la solubilización, se realizó la cuantificación de concentración de las proteínas mediante el método de Bradford (Cuadro 2) y se determinó la cantidad de tripsina necesaria por tratamiento (Cuadro 3).

En la Fig. 4 se observan el marcaje de las δ -endotoxina CryIAb con biotina. Estas proteínas se utilizaron para realizar los ensayos de unión *in vitro*. Se obtuvo un patrón característico de la proteína CryIAb en donde se observa una banda fuerte de aproximadamente 130 KDa que pertenece a la protoxina y una banda de aproximadamente 70 KDa perteneciente a la toxina. La proteína CryIAb no se observó completamente pura ya que predominó una banda contaminante de 35 Kda. Debido a la presencia de bandas contaminantes, algunas veces se recomienda purificar las proteínas a homogeneidad por medio de intercambio iónico. Sin embargo, para el fin de esta investigación no fue problemático usar proteínas con bajos niveles de contaminantes como en este caso ya que lo que se busca es ver si hay unión o no. En la Fig.5 se decidió realizar un nuevo marcaje de otra proteína CryIAb conjuntamente con el marcaje de la proteína GP3. Como resultado de este marcaje, se observa un barrido completo en donde las bandas predominantes para la toxina GP3 se esperaba que fueran de 130 y 60 Kda (comunicación personal, Dra. A. Bravo) pero en este caso no se lograron observar. En este caso, sí era recomendable purificar por la columna de intercambio para eliminar el exceso de contaminantes. Posterior al marcaje de la proteína CryIAb con biotina se determinó la concentración de la proteína mediante el método de Bradford (Cuadro 4 y Fig 6). La concentración final de la proteína fue de: 0,098 mg/ml. En las Figs. 7A, 7B y 7C se observan cortes de 5 μ m del intestino de *M. sexta* y *T. orizicolus*. En ambos cortes se observan las microvellosidades (mv) apicales del intestino medio en donde usualmente se observa la unión de la toxina en insectos susceptibles. Se observó además la unión de la toxina CryIAb (flecha) a las microvellosidades del epitelio intestinal de *Manduca sexta* (Fig. 7A), observándose en todos los cortes analizados. La toxina CryIAb se unió uniformemente a lo largo de las

microvellosidades del epitelio intestinal del intestino medio de *M. sexta*. Por el contrario, en la Fig. 7B la unión positiva de la toxina GP3 al epitelio intestinal de *T. orizicolus* fue leve y no fue uniforme a lo largo de todo el epitelio intestinal del insecto.

DISCUSION

En el caso de *Tagosodes orizicolus* y homópteros en general, existe una falta de información acerca del ambiente luminal del intestino, como por ejemplo, la composición enzimática y el pH. Se han reportado enzimas salivares como esterases y enzimas provenientes de las glándulas accesorias como amilasas, maltasas, invertasas y proteinasas en chinches, en donde el pH intestinal es de 6,8 a 7 y de 9 dependiendo de la especie (A.T. Dow, 1986). Sin embargo, la falta de información en homópteros causa una mayor incertidumbre a la hora de determinar si las enzimas digestivas del insecto son capaces de procesar la protoxina a toxina activada, para la formación del poro y consecuentemente la iniciación efecto tóxico en el epitelio intestinal.

Asimismo, existen pocos reportes de δ -endotoxinas tóxicas para homópteros. Esta falta de información sumada a los hábitos alimenticios del insecto (chupador) conlleva a la realización de bioensayos más elaborados en donde se podría requerir solubilizar la toxina, para suplir así, la posible falta de las enzimas proteolíticas del intestino de *T. orizicolus*. Además, se debe optimizar el bioensayo para poner en contacto el insecto con la solución tóxica. Por lo tanto de ser requeridas la solubilización y en algunos casos la tripsinización de las toxinas, ambos procesos deben optimizarse con cada cepa en particular y no se puede generalizar la metodología para todo tipo de cristal. Se debe además calibrar la cantidad de tripsina que se va a utilizar. Si la solubilización de los cristales de algunas cepas de *Bt* es un factor clave para la realización de los bioensayos con *Tagosodes orizicolus*, es recomendable establecer las condiciones óptimas de solubilización para cada una de ellas. En esta investigación se observó que una buena solubilización para un determinado cristal de una cepa determinada no garantizó una buena solubilización para otros cristales.

Debido a que *Bemisia tabaci* y *Tagosodes orizicolus* pertenecen al mismo orden, se decidió utilizar la cepa GP3 para los ensayos de unión. Esto debido a que consideramos que existe una mayor posibilidad de que una cepa tóxica para mosca blanca resulte más afin a los receptores de *Tagosodes orizicolus* que otras cepas efectivas para otros ordenes como Lepidoptera. Sin embargo, en una investigación posterior y como resultado de la realización de bioensayos burdos preliminares con esporas y cristales liofilizados de la cepa GP3 (no se muestran en esta investigación) no se obtuvo un efecto tóxico contra *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae). Sin embargo, resultaría interesante analizar en futuros bioensayos si el cristal solubilizado y tripsinizado produce el mismo efecto. Este resultado parece apoyar los observados en numerosos estudios que demuestran que la toxicidad de *Bt* en una especie en particular no garantiza la toxicidad en especies relacionadas (Glare and Callaghan, 2000). Por lo que se concluye que la susceptibilidad de insectos hacia cepas de *Bt* debe ser estudiada caso por caso (Glare and Callaghan, 2000).

En varios de los casos estudiados, las características de la unión de la toxina correlaciona con su toxicidad. Sin embargo, estas correlaciones no siempre se dan. Resultados similares han sido reportado en la literatura en donde se ha demostrado que toxinas poco potentes se unen con una afinidad similar o mayor que toxinas más potentes (Peyronnet, 1997). Esto se debe principalmente, a que la unión sí es necesaria pero no suficiente para la toxicidad, por lo que no provee un índice de la potencia de la toxina. Sin embargo, la unión observada de la cepa GP3 demuestra que si hay una interacción de la toxina, probablemente con los receptores en las microvellosidades del epitelio intestinal, sin embargo constituye un caso de interacción inespecífica, en dónde el segundo paso en el proceso de unión de las toxinas (unión irreversible), no se lleva a cabo por lo que no hay efecto tóxico notable.

REFERENCIAS

- Aranda, E. 1996. Análisis de las interacciones in vitro e in vivo de las δ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* con el epitelio intestinal medio de diferentes insectos plaga. Tesis para optar por el título de doctor en biotecnología. UNAM. Cuernavaca, Morelos.
- A.T. Dow. 1986. Insect midgut function. Adv. In Insect Physiol. 19: 189-296.
- Bauer, L.S. y H.T. Pankratz. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego on midgut cells of the cottonweed leaf beetle. *J. Invertebrate. Pathol.* 60:15-25.
- Bravo,A., S. Jansens y M. Peferoen. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebrate. Pathol.* 60: 237-246.
- Bravo,A., K. Hendrickx, S. Jansens y M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebrate Pathol.* 60: 237-246.
- Endo , Y., y Nishiitsutsuji-Uwo, J. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin : Histopathological changes in the silkworm midgut *J. Invertebrate. Pathol* 36, 90-103.
- Guy Honée y Bert Visser. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* cristal proteins. *Entomol. Exp. Appl.* 69:145-155.

- Hofmann, C., Luthy, P., Hutter, R., and Pliska, V. 1988a. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *Eur. J. Biochem.* 173, 85-91.
- Hofmann, C., Vanderbruggen, H., Hofte, H., Van Rie, J. Jansens, S., and Van Mellaert, H. 1988b. Specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border of target insect midguts. *Pro. Natl. Acad. Sci. USA* 85:7844-7848.
- Knowles, B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. *Adv. Insect. Physiol.* 24:275-308.
- Masson, L., A. Mazza, R. Brousseau y B. Tabashnik. 1995. Kinetics of *Bacillus thuringiensis* toxin binding with brush border membrane vesicles from susceptible and resistant larvae of *Plutella xylostella*. *J. Biol. Chem.* 270 (20): 11887-11896.
- Payne, J. y R. Cannon. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling pests in the family Aphididae. US Patent No. 5, 262, 159.
- Peyronnet, O. 1997. Effect of *Bacillus thuringiensis* toxins on membrane potential of lepidopteran insect midgut cells. *Applied and Environmental Microbiol.* 63: 1679-1684.
- Shnepf E., Crickmore N., Van Rie J., Lereclus, D. Baum, Feitelson J., Zeigler D.R. and Dean D.H. 1998. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* P. 775-806.

LEYENDAS DE FIGURAS

Cuadro. 1 Procedencia de las cepas 5-X-m y 40-X-m de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en el estudio.

Cuadro. 2 Determinación mediante el método de Bradford de la concentración (mg/ml) proteica de las diferentes fracciones de los gradientes de sacarosa realizados con las cepas 5-X-m y 40-X-m solubilizadas.

Cuadro. 3 Determinación de la cantidad de tripsina requerida por tratamiento.

Cuadro. 4 Determinación de la concentración (mg/ml) de la proteína CryIAb mediante el método de Bradford.

Fig. 1 Gradientes de sacarosa con las cepas 40-X-m y 5-X-m.

Fig.2 Gel de poliacrilamida al 10% con las cepas 40-X-m y 5-X-m. Se observan las diferentes fracciones de los gradientes tratadas con buffer carbonatos. Carril #1 Marcador de alto peso molecular, carril#2 fracción 1. del gradiente de sacarosa correspondiente a los cristales pequeños ovalados, carril#3 fracción 2. del gradiente de sacarosa correspondiente a cristales bipiramidales grandes, carril#4 fracción 1. del gradiente de sacarosa correspondiente a los cristales pequeños ovalados, carril#5 fracción 2. del gradiente de sacarosa correspondiente a cristales bipiramidales grandes. Carriles #6,7,8,9, pastillas correspondientes a las diferentes fracciones solubilizadas.

Fig.3 Gel de poliacrilamida al 10% con las cepas 40-X-m y 5-X-m. Se observan las diferentes fracciones de los gradientes tratadas con buffer CAPS. Gradiente de sacarosa correspondiente a los cristales pequeños ovalados carril#1, carril#2 Marcador de alto peso molecular, carril#3 fracción 2. del gradiente de sacarosa correspondiente a cristales bipiramidales grandes, carril#4 fracción 1. del gradiente de sacarosa correspondiente a los cristales pequeños ovalados, carril#5 fracción 2. del gradiente de sacarosa correspondiente

a cristales bipiramidales grandes. Carriles #6,7,8,9, pastillas correspondientes a las diferentes fracciones solubilizadas. solubilizadas.

Fig.4 Western Blot utilizando la proteína CryIAb utilizando como sustrato luminol. Pozo #1: Marcador de amplio rango biotinado, pozo #2: Toxina CryIAb biotinada.

Fig.5 Western Blot de la proteína CryIAb y la cepa GP3 utilizando como sustrato luminol. Carril#1 Marcador de amplio rango biotinado, carril #2 proteína CryIAb biotinada, carril #3 Proteína GP3 biotinada.

Fig.6 Determinación de la concentración de la proteína CryIAb mediante el método de Bradford. Cn final de proteína CryIAb: 0,098 mg/ml *, pendiente: 0,057, n:5.

Fig. 7 Localización inmunocitoquímica de las δ -endotoxinas GP3 y CryIAb. A Se presenta un corte del tejido intestinal de *Manduca sexta* en donde se observa la unión uniforme (flecha) de la toxina CryIAb al epitelio intestinal de las microvellosidades del intestino medio. B y C Se observan cortes de los tejidos del intestino de *Tagosodes orizicolus*. B control (tejido sin toxina). C Se observa la unión no uniforme (flecha) de la toxina GP3 al epitelio apical de las microvellosidades del intestino medio de *Tagosodes orizicolus*.

Código	Lugar de colecta	Insecto	Fecha de colecta
40-X-m	San Pedro, Sabanilla	Membracidae	Abril, 2001
5-X-m	San Pedro, Sabanilla	Membracidae	Abril, 2001

Cuadro. 1

Cepa	H2O+Muestra+ React. de Bradfod	Fracción (grad.)	Tampón	Concent.	Absorbancia 600 nm
40-X-m	795µl+5µl+200µl	1	CAPS	0.04 mg/ml	0,011
40-X-m	795µl+5µl+200µl	2	CAPS	0.1 mg/ml	0,036
40-X-m	795µl+5µl+200µl	1	CAPS	0.056 mg/ml	0,023
40-X-m	795µl+5µl+200µl	2	CAPS	0.15 mg/ml	0,047
5-X-m	790µl+10µl+200µl	1	Carbonat.	0,009 mg/ml	0,059
5-X-m	790µl+10µl+200µl	2	Carbonat.	0,49 mg/ml	0,349
5-X-m	790µl+10µl+200µl	1	Carbonat.	0,1 mg/ml	0,038
5-X-m	790µl+10µl+200µl	2	Carbonat.	0,61 mg/ml	0,416

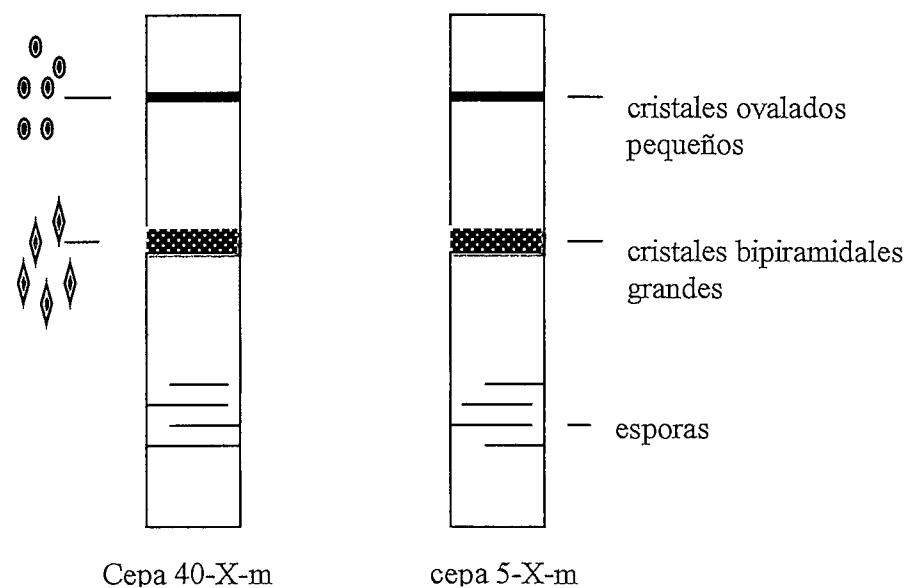
Cuadro. 2

Cepa	Fracción Gradiente	tratamiento	µg totales de proteína	µg de tripsina 1µg trip./20µg prot.
40-X-m	1	CAPS	20 µg	1µg
40-X-m	2	CAPS	50 µg	2.5µg
40-X-m	1	CAPS	28 µg	1.4µg
40-X-m	2	CAPS	75 µg	3.75µg
5-X-m	1	Carbonat.	4.5 µg	0.22µg
5-X-m	2	Carbonat.	245 µg	12.25µg
5-X-m	1	Carbonat.	50 µg	2.5µg
5-X-m	2	Carbonat.	305 µg	15.5µg

Cuadro. 3

Volumen de BSA/toxina+H ₂ O+ React. de Bradford	Cepa	Concent.	Absorbancia 600 nm
0µl+800µl+200µl	CryIAb	0 mg/ml	0
25µl+775µl+200µl	CryIAb	2.5 mg/ml	0.229
50µl+750µl+200µl	CryIAb	5 mg/ml	0.441
100µl+700µl+200µl	CryIAb	10 mg/ml	0.774
200µl+650µl+200µl	CryIAb	20 mg/ml	1.173
10µl tox. CryIAb +790µl+200µl	CryIAb	0.098 * mg/ml	0.090

Cuadro. 4



Gradientes de sacarosa

Fig. 1

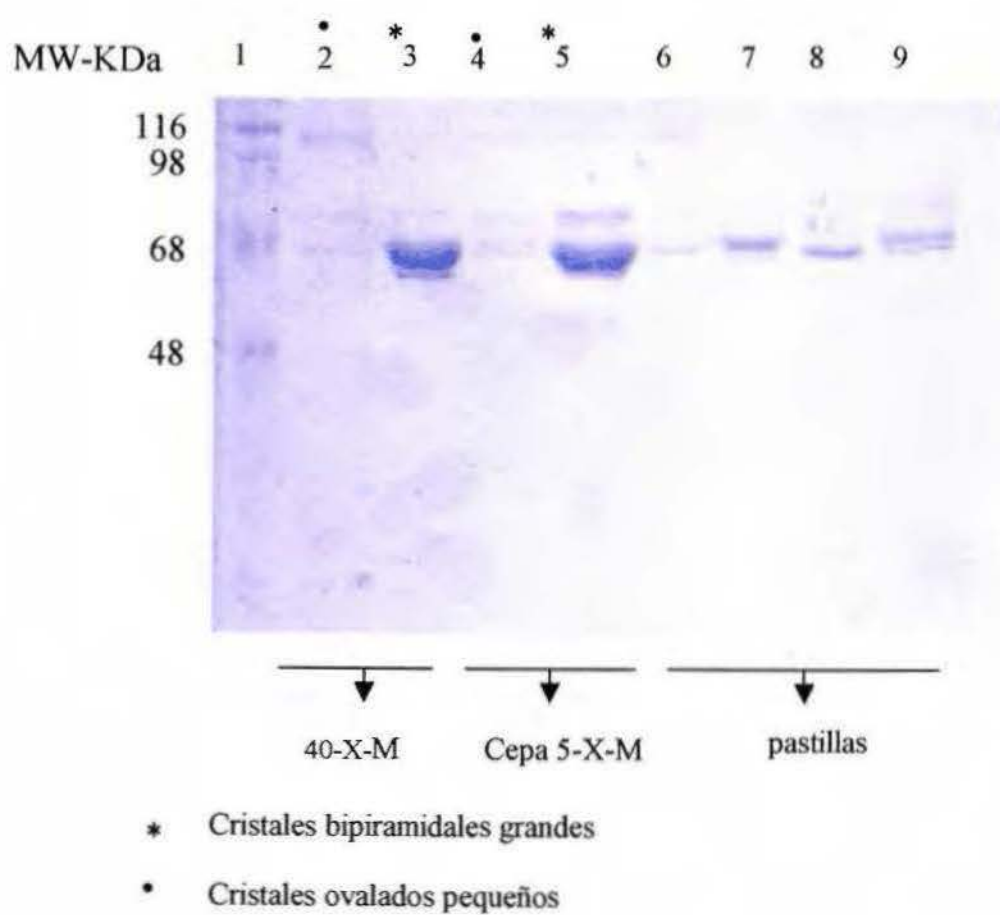


Fig. 2

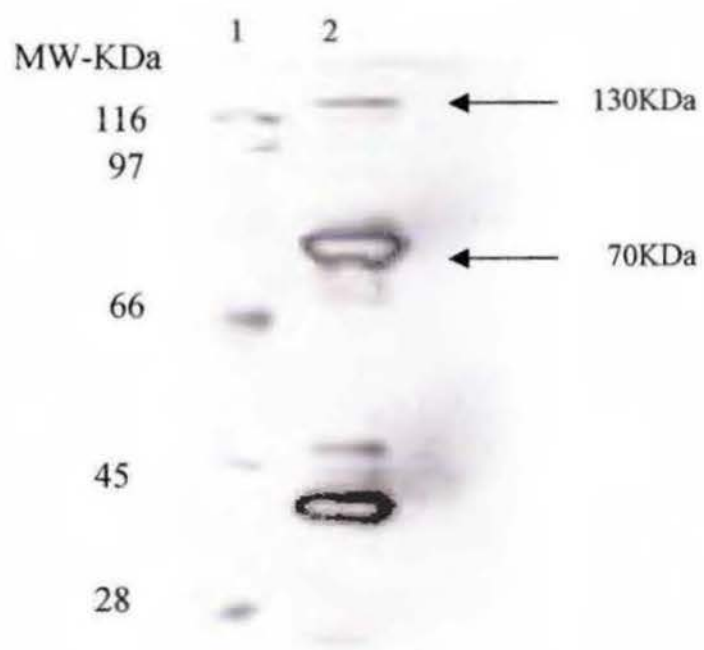


Fig.4

MW-KDa 1 2 3

200 →
116 →

66 →

45 →

28 →

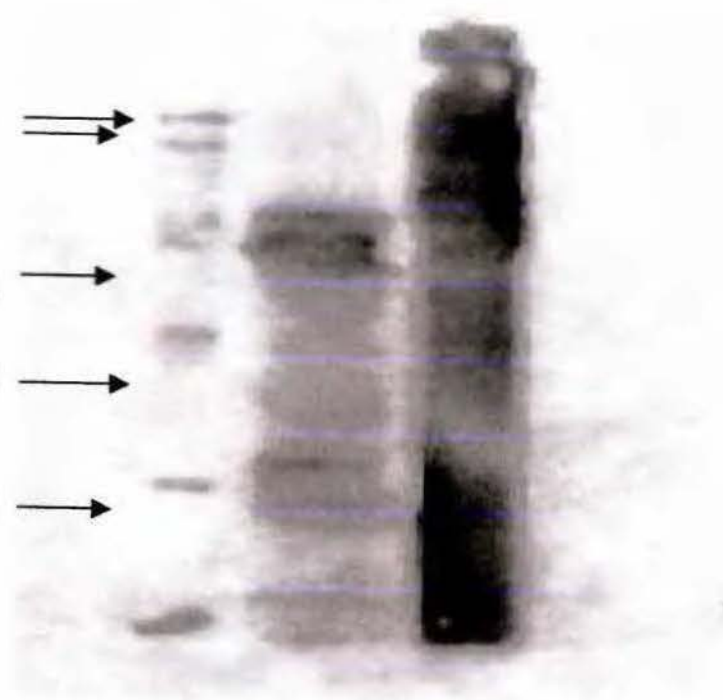
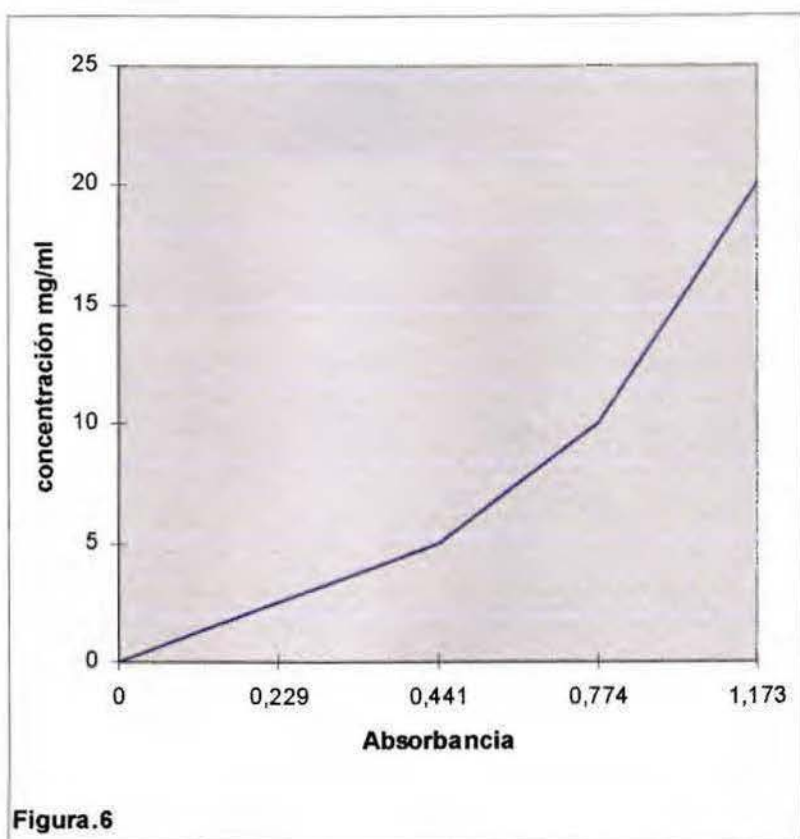


Fig.5



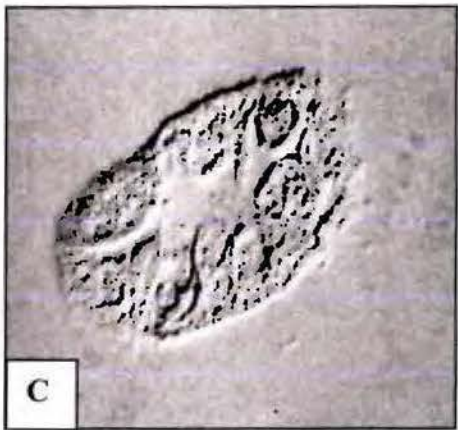
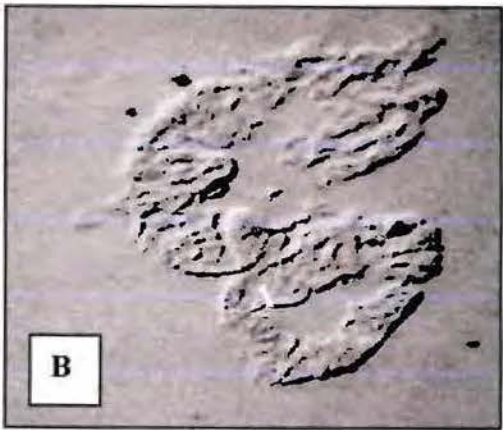


Fig. 7

CAPITULO 4

A novel bioassay procedure to evaluate *per os* toxicity on the rice delphacid, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae)

Rebeca Mora¹, Ana M. Espinoza^{1,2} and Jorge Ibarra³

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

³CINVESTAV, Irapuato México

A novel bioassay procedure to evaluate *per os* toxicity on the rice delphacid, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae).

Rebeca Mora¹, Ana M. Espinoza^{1,2} and Jorge Ibarra³

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

³CINVESTAV, Irapuato México

ABSTRACT

A reliable bioassay procedure was developed to test putative ingested toxins on the rice delphacid *Tagosodes orizicolus*. Initially, several colonies were established under greenhouse conditions, to provide enough healthy test individuals during the bioassay standardization. For this purpose, a rearing system was established, using rice plants to nurture the insect, kept in cages at 18-30°C and 80% RH. The procedure efficiently kept the colony free of predators and parasitoids for more than 12 generations. For the bioassay, an *in vitro* feeding system was developed for third- and fourth-instar nymphs. Insects fed through parafilm membranes on sugar (10% sucrose) and honey bee (1:48 vol/vol) solutions, observing a natural mortality of 10-15% and 0-5%, respectively, for a period of 12 days. Results were reproducible under controlled temperature, humidity and photoperiod conditions during the bioassay (18 ± 0.1 °C at night and 28 ± 0.1 °C during the day, 80% RH and a 12:12 day:light photoperiod), in contrast to the results observed when these variables were not controlled. In addition, natural mortality was quantified on insect colonies, originally collected from three different geographic zones in Costa Rica, with no significant differences between colonies. This bioassay procedure may provide a bases for

screening a large number of toxins, such as those found in a great diversity of *Bacillus thuringiensis* strains, and eventually develop transgenic rice resistant to this pest.

KEY WORDS

Tagosodes orizicolus, Homoptera, rice delphacid, bioassay, rearing, sugar diet

INTRODUCTION

The rice delphacid (RDel) *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae) is a monophagous insect pest of rice (*Oryza sativa*), with a wide distribution in the neotropics of the American continent. RDel is an insect pest of high economic importance not only because it is the vector of the rice hoja blanca virus (RHBV), but also because it causes mechanical damage through feeding and oviposition on the host plant. The use of chemical insecticides such as endosulfan, fenitrothion and fenucarb, which are highly toxic to mammals, is the most common control strategy against this pest (Saunders *et al.*, 1998). Therefore, alternative control measures should be developed, which may prove to be innocuous to human beings, less harmful to the environment and with a minimum effect to agroecosystem biodiversity, including natural enemies.

One of such alternatives may be provided by the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). During sporulation, *Bt* synthesizes crystalline parasporal inclusions composed of insecticidal proteins, known as δ -endotoxins (Crickmore *et al.*, 1998), which are innocuous to humans and highly toxic and specific to pests. Based on the insecticidal activity of *Bt*, many commercial bioinsecticides have been developed for the control of lepidopteran, dipteran, and coleopteran larvae of economic importance (Glare and O'Callahan, 2000). Additionally, the use of *Bt* genes to develop insect resistant transgenic plants has proven to be highly effective, and may be an important alternative for the control of sucking insect pests, such as RDel.

Either a toxin from *Bt* or any other proteinaceous toxin active against RDel, should be the result of extensive screening projects, where test individuals are subjected to a number of different toxic agents, under controlled bioassay conditions. Those conditions must be previously standardized, in order to obtain repetitive, reliable results. Healthy individuals should be used in the bioassay and no more than 10% mortality should be allowed in the control population (Ibarra and Del Rincón, 2001). Evaluation of stomach poisons must rely on an effective feeding technique that ensures the ingestion of sufficient doses, which is the bases for a reliable screening program of toxins (in coarse or qualitative bioassays), and also to determine dose-mortality relationships, directed towards the estimation of LC_{50} s (in quantitative bioassays) (Ibarra and Del Rincón, 2001).

So far, no bioassay procedure has been published for RDel neither for any homopteran species, to test *per os* toxicity, in contrast to the abundant information available for lepidopteran, coleopteran, and dipteran larvae (De León and Ibarra, 1995; Ibarra and Federici, 1987; McLaughling *et al.* 1984) However, feeding systems for virus acquisition by homopteran species have been reported before (Espinoza, 1989). These systems are based on the sucking of sugar solutions through Parafilm membranes that imitate, to some extent, the penetration of plant tissues and the sucking of sugar-rich content in phloem sieve elements, with a high turgor pressure (Benrey and Lamp, 1994).

In this report, we present the development of a procedure to establish a healthy and stable RDel colony that may provide enough test individuals for bioassay. Also, an *in vitro* feeding procedure was developed to test *per os* toxicity on RDel nymphs which showed natural mortality rates lower than 10%, during a period of 12 days. These procedures may provide a basis for a reliable screening program of *B. thuringiensis* toxins, or any other stomach poisons.

MATERIAL AND METHODS

Field collection of *T. orizicolus* Native populations of RDel were collected in three rice growing regions of Costa Rica: Turrúcares, Tejar de Alajuela and Bagaces, using a D-Vac device (Craftsman 32 cc, USA), modified to trap the insects in a soft mesh cloth located between two extensions of the suction duct. Twelve transects were sampled on each field for four minutes per transect, on randomly selected zones, during the morning and in absence of rain. The collected material was transferred to plastic bags and then sorted out for RDel nymphs and adults in the laboratory. The selected insects were then transferred to sealed cages (30 X 40 X 40 cm) covered with fine mesh, which contained four three-month-old rice plants each (cultivar CR 5272). Cages were kept under insectary conditions (80% relative humidity and temperatures ranging from 18°C to 35°C).

Establishment of *T. orizicolus* colonies In order to eliminate any parasitoids, predators and entomopathogenic fungi coming along with the field collections, insects were subjected to a quarantine period of two life cycles. Cages were monitored every other day to eliminate spiders, ants, beetles and parasitoids that could affect the progeny of *T. orizicolus*. Each cage contained a maximum of six four-month-old rice plants, growing in 250 ml plastic pots with fertilized soil (1/3 Vermicompost and 2/3 rice bran). Pots were weeded weekly and old leaves were manually removed. Younger, more vigorous plants were introduced regularly to replace old plants. Plants were watered every other day and kept under field capacity. New colonies were established by taking 30 fourth- or fifth-instar nymphs from the original cages, and transferred to 250 ml pots containing four four-month-old plants covered by plastic cylinders with air openings sealed with fine mesh. These cages were kept for approximately 22 days until progeny was observed. When progeny reached the third instar, it was transferred to cages with the dimensions and conditions mentioned above.

Feeding assays Several approaches were tested to induce feeding of RDel nymphs on artificial solutions. All used fully stretched parafilm membranes to seal the different vials tested. First, Eppendorf tubes (1.5 ml) were tested, by perforating three holes in the cap, filling the tube with sugar solution, and sealing the holes with parafilm. Each tube was then introduced in a vial with RDel nymphs (Fig.1A). In a second trial, 10 ml glass vials were

tested. These were filled with 2 ml sugar solution, sealed with Parafilm and inverted over a 20 ml plastic cup, through an opening in the cover. Insects were introduced through an opening that was later sealed with cotton (Fig.1B). Finally, 6-cm Petri dishes were tested. These were filled to the top with sugar solution and covered with Parafilm. Each Petri dish was then introduced into a larger dish (15 cm in diameter) with a filter paper on the floor. Insects were then introduced using a mouth aspirator (Fig.1C).

Variants within each experimental assay included the use of 5, 10 and 20% sucrose solutions, previously autoclaved, as well as a 1:48 dilution of bee honey in sterile water. Also, the adaptability of different growth stages of *T. orizicolus* was evaluated in each feeding system, by recording the mortality during the 12-day assay period. Also, the effect of perforating the Parafilm membranes with a N° 0 dissection needle was evaluated, as well as the direct feeding on the sugar solution, without the use of parafilm. For this purpose, twenty fifth-instar RDel nymphs were placed in a Petri dish, with droplets of sugar diet stained with a blue baking dye, to detect active feeding. All the experiments were carried out in an environmental chamber (White Westinghouse model 624) preset at a temperature of $18^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ at night and $28^{\circ}\text{C} \pm 0.1$ during the day, 80% humidity and a 12:12 h photoperiod.

Effect of the colony origin on the natural mortality of *T. orizicolus* RDel populations from Turrúcares, Tejar and Guanacaste were separately subjected to feeding bioassays, in order to determine differential adaptability to the artificial feeding system. Each bioassay included six fourth-instar nymphs and four replicates per population, feeding on 10% sucrose diets and using the Petri dish feeding system. Mortality was recorded 72 hours after the experiment started. Four of the bioassays were performed in a growth room where only the photoperiod (12:12 h) and the luminosity (592 ± 2.76 lux) were controlled. The remaining bioassays were carried out in an environmental chamber under the conditions mentioned above.

RESULTS

Establishment of *T. orizicolus* colonies. Three colonies of *T. orizicolus* from Bagaces, Turrúcares and Tejar de Alajuela were established in the insectary. The colony from Bagaces started on May, 2001 and has been continuously maintained for approximately ten generations. The Tejar de Alajuela's colony began on August, 2001 and was maintained for about five generations, whereas the colony from Turrúcares initiated a month later and was maintained for four generations. Quarantine of field collected insects was necessary as parasitization by *Haplogonatopus hernandezae* (Hymenoptera: Dryinidae) on nymphs and adult females was observed (Fig.2A and B). Presence of assassin bugs (Hemiptera: Reduviidae), predators of immature stages and adults of *T. orizicolus*, was also frequent. Both natural enemies were eliminated from the cages by manually removing adult predators and parasitized delphacids.

After the quarantine period, colonies also suffered from predation caused by ants and by *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter (Hemiptera: Miridae). Ants were eliminated from the rearing cages by immersing the supporting cage feet into soap water-filled containers, and by spreading boric acid near the cages. About *C. lividipennis*, apparently seedlings coming from the greenhouse were originally infested with this insect and manual removal from cages eventually was ineffective, as predation of RDel eggs was observed from newly emerged *C. lividipennis* nymphs (Fig. 3A, B and C). Exclusion of this insect from rearing cages was efficiently achieved by covering the emerging seedlings with plastic bags. In addition, the fumagin fungus, although an indirect nuisance to the RDel colonies, was detected, but only in highly dense colonies.

Feeding assays. From the three feeding systems tested, the most successful solution container was the Petri dish. In the Eppendorf tube system, no feeding behavior was observed at all, and test insect died in less than 24 hs. In the inverted tube system, occasional feeding was observed, with a mean survival of 48 hs. In the Petri dish system, frequent feeding was observed and most test insects survived for 14 days. In an attempt to

increase the efficiency of this system, turgor pressure of the sugar solution within the Petri dish was increased by injecting a higher volume; however, no significant difference was observed between both Petri dish feeding systems ($X^2=0.827$, $P=0.363$, $d.f.=1$, $N=80$).

Optimal sucrose concentration (5%, 10% or 20%) for the Petri dish feeding system was determined through a series of bioassays, using 12 fifth-instar nymphs per concentration and four replicates each. Mortality, recorded at the sixth day, indicated that the 10% sucrose solution showed the lowest rate (Fig. 4). Still, mortality was lower or equal to 10% in all the bioassays ($X^2=15.223$, $P=0.000$, $d.f.=3$, $N=120$). Alternatively to the sucrose diet, a diluted bee honey solution was tested. Sucrose and honey treatments were repeated four times on 20 third- and fourth-instar RDel nymphs, each. Mortality, recorded after 72 hs, indicated that three out of four replicates showed less than 5% mortality and the fourth replicate showed no mortality, when diluted honey was tested; whereas two replicates showed 10% mortality, and the third and fourth replicates showed 15 and 20% mortality, respectively, when sucrose solution was tested (Fig. 5). Additionally, sucrose solution was colored with green cooking dye to test any possible attraction, but no difference was observed between the colored and non-colored diets ($X^2=2.857$, $P=0.091$, $d.f.=1$, $N=60$). Rather, fungal contamination was observed in the colored solution.

Three long-term bioassays were carried out, recording the mortality for 18 days. Both sucrose and honey solutions were tested on 15 third- and fourth-instar RDel nymphs per each of three replicates. Although similar, mortality was lower on insects fed with honey diet, especially on the first and the last three days of the bioassays (Figures 6 and 7). Still, by the 14th and 15th days, 50% mortality was observed in both treatments; however, and most importantly, less than 10% mortality was recorded during the first 12 days of the bioassays.

To determine the optimal developmental stage of *T. orizicolus* for the bioassay, three different groups were tested: a) first- and second-instar nymphs, b) third- and fourth-instar nymphs, and c) fifth-instar nymphs. Both, sucrose and honey diets were tested in two replicates, and mortality was recorded at the sixth day. Practically 100% mortality was

recorded by the second day of the experiment, in both sucrose and honey diets, when first and second instars were tested (Fig. 8). In contrast, third and fourth instars showed less than 10% mortality, whereas fifth instars showed mortalities below or equal to 10%. That is, third and fourth instars showed the highest survival rate in the bioassays ($X^2=76.312$, $P=0.000$, $d.f.=3$, $N=150$). Noticeably, all the surviving nymphs from the last two groups became adults. Mortality was always lower when honey diet was used ($X^2=8.665$, $P=0.003$, $d.f.=1$, $N=200$).

Interestingly, when RDel nymphs were exposed to 10% sucrose droplets stained with blue cooking dye (no Parafilm mediated), they survived for one week (Fig. 9A, 9B and 9C), and feeding was corroborated by direct microscopic observations of the nymph abdomens. Based on this idea, Parafilm from the Petri dish feeding system was perforated with dissecting needles, effectively decreasing the RDel nymph mortality ($X^2=13.636$, $P=0.000$, $d.f.=3$, $N=150$).

Effect of the colony origin on the natural mortality of *T. orizicolus*. The adaptability of three different RDel geographical populations to the artificial feeding system was evaluated in six replicates. Figure. 10 shows that natural mortality was always close to 10% and no significant difference was observed among the populations. When the same series of bioassays were carried out without controlling temperature and humidity, the recorded mortality was much higher and variable among the populations.

DISCUSSION

A rearing system for *T. orizicolus* was developed under insectary conditions which allowed to maintain the insect colony for 12 generations and provided sufficient material to perform numerous bioassays. Furthermore, a feeding system through Parafilm membranes for nymphs of third and fourth instars was established, using sucrose and honey solutions, in which the mortality was lower than 10% for up to 12 days. In addition, no

difference in the adaptability to insectary conditions was observed when insects from different localities of Costa Rica were used.

It is worth noticing the importance of frequent replacement of old plants for young, vigorous rice plants to maintain a healthy RDel colony in the insectary. Reduction of nutrients in older plants affects the insect's reproductive performance and also accumulates sugar secretions which attracts natural enemies (i.e. ants) and reduces the photosynthetic surface when the fumagine fungus grows on them. However, very young plants (less than two months old), although more nutritious, show less oviposition as it occurs mostly in the well-developed central veins of the leaf blades.

Among the artificial feeding systems tested, the most successful proved to be the Petri dish filled with a sugar or bee honey solution and covered by Parafilm. Other systems were significantly less efficient. According to the observations made during the series of tests, the success of the Petri dish system was apparently based on the availability of an extensive feeding surface and a more open environment (the larger Petri dish). Additionally, the use of filter paper in the bottom of the larger Petri dish facilitated the insect movement throughout the feeding system. Another positive addition was the perforations to the Parafilm membrane which may attract the insects towards the diet. Limited feeding surface and available space, as well as interference among individuals, tend to affect negatively their feeding behavior.

The increase of feeding on perforated Parafilm as well as the direct feeding of *T. orizicolus* on "open" sugar solutions (in absence of a membrane) may indicate that RDel actually feeds on nectar and water droplets in nature. It is important to remember that RDel is a monophagous species (Benrey and Lamp, 1994) and that isolated rice fields are readily infested, suggesting that RDel may survive for extended periods only on nectar and other liquid food sources. Of course, hibernation as well as estivation may also play a role in these particular situations.

It was obvious that, even if less than 10% of natural mortality during a period of 12 days was achieved, artificial feeding on sugar or honeybee solutions affected the RDel normal development and behavior. Maintenance under such artificial conditions made the insects more susceptible to temperature and humidity stress. Mortality was higher and more variable when feeding tests were conducted under uncontrolled conditions, than when they were conducted in the environmental chamber. Certainly, mortality was much lower and for longer periods of time when RDel was reared on rice plants (data not shown).

Other abiotic factors may influence the adaptability of RDel to insectary conditions, and that was the reason to test populations from several locations. Insects collected in Bagaces and Turrúcares are adapted to the lowlands, with temperatures between 18°C and 35°C. These colonies were brought to Sabanilla de Montes de Oca (1,100 meters above sea level) where night temperatures can be as low as 14°C. Differences in survival and life cycle length were observed (data not shown) during the establishment of the colonies, suggesting that both climate change and genetic variability between populations (Hernández *et al.*, 2003) may influence the adaptability of each population to the insectary in a new geographic area. Therefore, standardization of the rearing techniques as well as the strict control of temperature, humidity and photoperiod is essential to optimize the maintenance of the colony. In spite of these differences, all colonies showed mortality values below 10% when tested with the Parafilm feeding system and under climatic controlled conditions in an environmental chamber. Susceptibility was readily revealed when these conditions were not controlled.

REFERENCES

- Benrey B. and W.O. Lamp.1994. Biological control in the management of planthopper populations. Pp.519-549. In R.F. Denno y C.J: Perfect. (ed). Planthoppers, their ecology and management. Chapman and Hall, Col. New York.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Molec. Rev. 62: 807-813.
- De León, T.and J.E. Ibarra. 1995. An Alternative Bioassay Technique to Measure Activity of Cry III Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Journal of Economic Entomology 88(6): 1596-1601
- Espinoza M. A. 1989. Studies on the aphid transmission factor of Cauliflower Mosaic Virus. Tesis sometida para optar por el título de doctor en filosofía. John Innes Institute, Norwich England.
- Glare. T. and Callaghan. M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley and Sons, Ltd. New York. Pp 332.
- Guy Honée and Bert Visser. 1993. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* crystal proteins. *Entomol. exp. appl.* 69:145-155.
- Hernández M. 1998. Análisis de la variabilidad genética de poblaciones de *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae) vector del virus de la hoja blanca del arroz. Tesis para optar por el grado de Magíster Scientiae. Ciudad Universitaria Rodrigo Facio. Universidad de Costa Rica.

- Ibarra, J.E. and B.A. Federici. 1987. An alternative bioassay employing neonate larvae for determining the toxicity of suspended particles to mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Ass.* 3:187-192.
- Ibarra, J.E. and M.C. Del Rincón-Castro. 2001. Cuantificación Toxicológica de *Bacillus thuringiensis*. En: *Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas*. P. Caballero y J. Ferré (Eds.) M.V. Phytoma-España, S. L. Valencia. pp. 133-152.
- McLaughling, R.E., H.T. Dulmage, R. Alls, T.L. Couch, D.A. Dame, I.M. Hall, R.I. Rose and P.L. Versoi. 1984. U.S. standard bioassay for the potency assessment of *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 against mosquito larvae. *Bull. Entomol. Soc. Am.* 30:26-29.
- Saunders J., Coto D and Kin A. 1998. Plagas invertebradas de cultivos anuales alimentarios de América Central. Manual técnico No. 29. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- Shnepf E.; Crickmore N.; Van Rie J.; Lereclus D.; Baum; Feitelson J.; Zeigler D.R. and Dean D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. P. 775-806.
- Tejeda A. and Navarro M. 1994. El Bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas. México.

LEYENDS TO FIGURES

Table 1. Mortality percentage of *Tagosodes orizicolus* in coarse bioassays using three loops of fully sporulated cultures (0.444mg/ml-0.666mg/ml solution) in twenty seven strains of *Bacillus thuringiensis*.

Table 2. Mortality percentage of *Tagosodes orizicolus* in coarse bioassays using liofilized spores and crystals (1mg/ml solution) observed in eight strains of *Bacillus thuringiensis*.

Figure. 1 Vials used for optimizing feeding conditions on bioassays with *T. orizicolus*. A. 1.5 ml Eppendorf B. Glass vial C. Petri Dish.

Figure. 2 A. Pupae of *H. hernandezae* in a rice leaf B. *T. orizicolus* female parasited by *H. hernandezae*.

Figure. 3 A. *Cytorhinus lividipennis* Reuter nymph (Hemiptera:Miridae) feeding on *T. orizicolus* eggs. B. *T. orizicolus* eggs C. *Cytorhinus lividipennis* eggs.

Figure. 4 Mortality percentage of *T. orizicolus* fifth instar nymphs after six days of feeding on different concentrations of sucrose solutions throught stretched Parafilm membranes.

Figure. 5 Mortality percentage at 72 hours of *T. orizicolus* third and fourth instar nymphs after feeding on two types of liquid diet through perforated Parafilm membranes.

Figure. 6 Observed average distribution of the mortality of *T. orizicolus* in three bioassays, after feeding on 1:48 honeybee dilution through perforated Parafilm membranes.

Figure. 7 Observed average distribution of the mortality of *T. orizicolus* in three bioassays, after feeding on 10% sucrose through perforated Parafilm membranes.

Figure. 8 Mortality percentage of *T. orizicolus* different instars after six days of feeding on two liquid diets through Parafilm membranes.

Figure. 9 A. Glass slides with drops of stained sucrose diet on which *T. orizicolus* is feeding. B. *T. orizicolus* feeding on drops of the stained diet. C. *T. orizicolus* nymph with traces of stained diet in its abdomen.

Figure. 10 Mortality percentage of *T. orizicolus* from three Costa Rican rice producing regions after feeding on a 10% sucrose diet through Parafilm membranes under controlled temperature and humidity conditions.

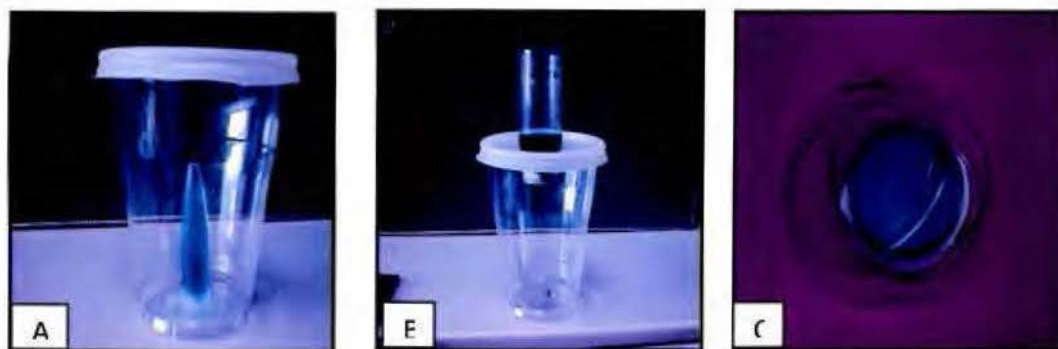


Figure. 1

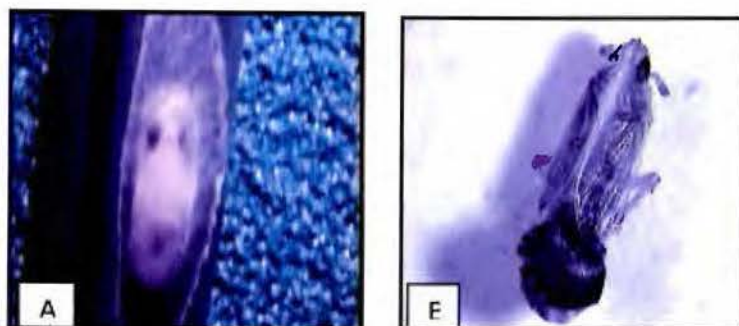
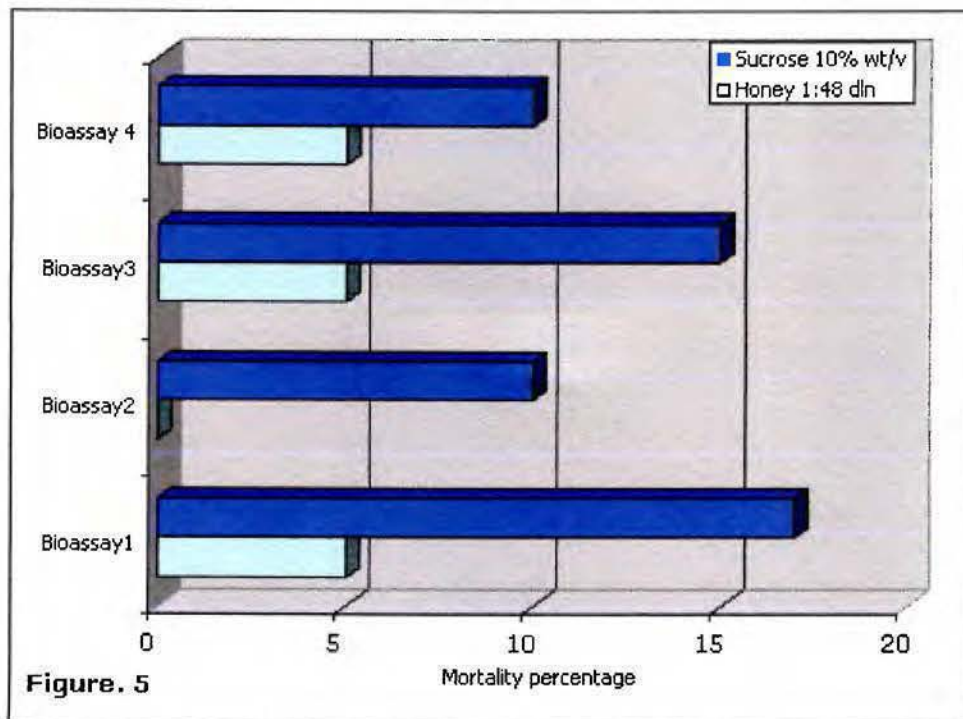
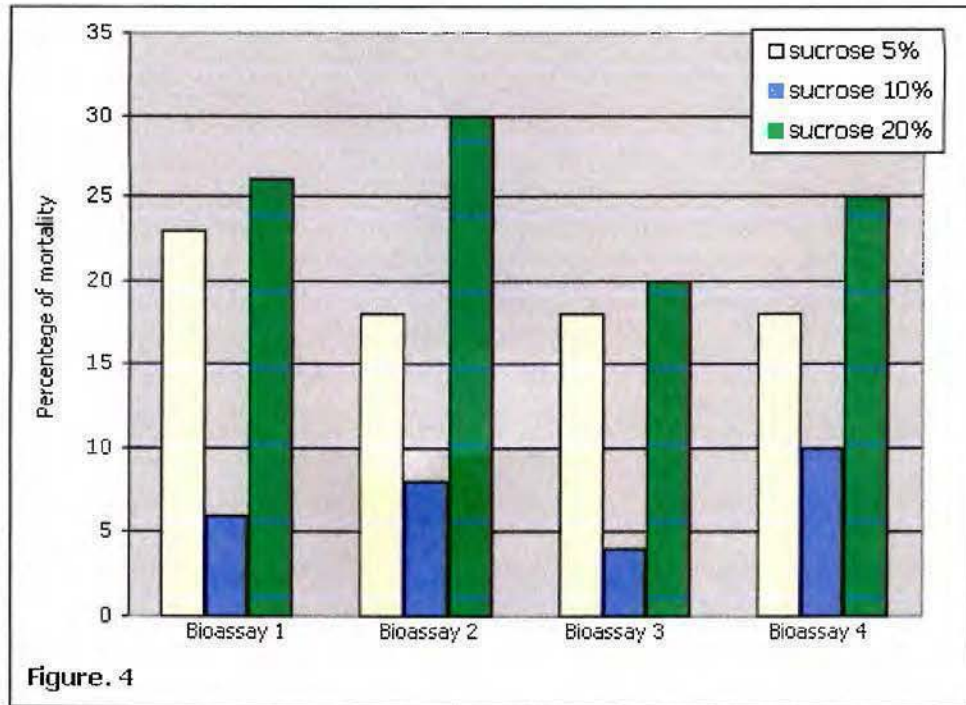


Figure. 2



Figure. 3



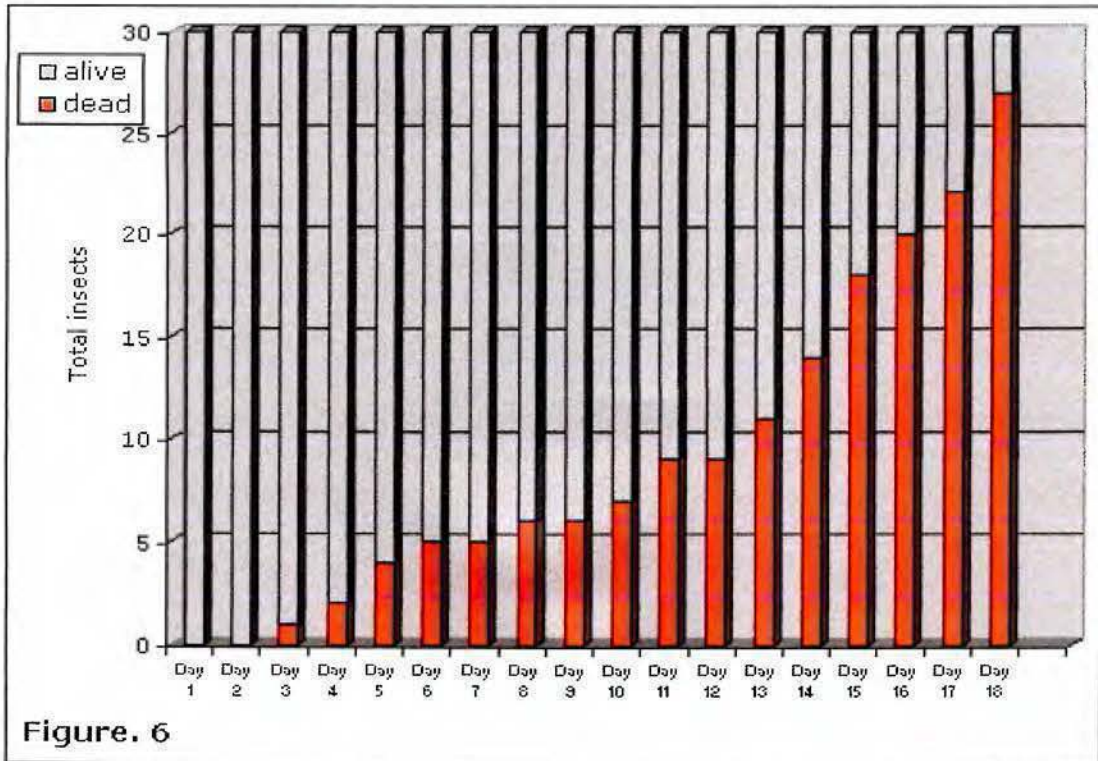


Figure. 6

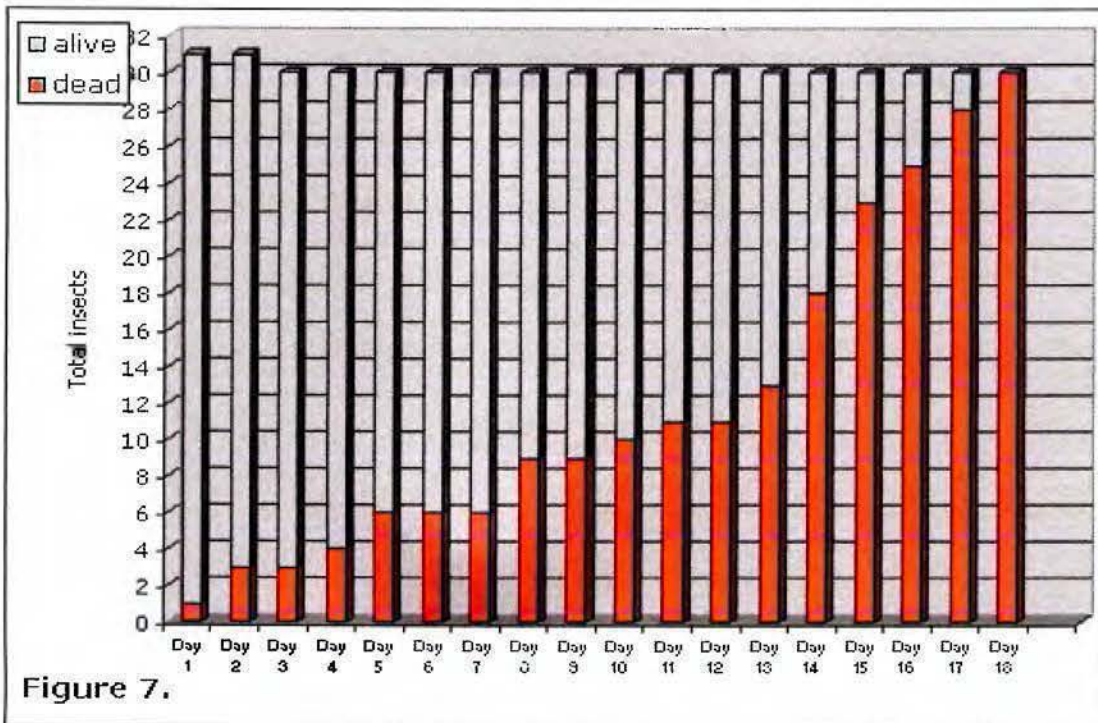
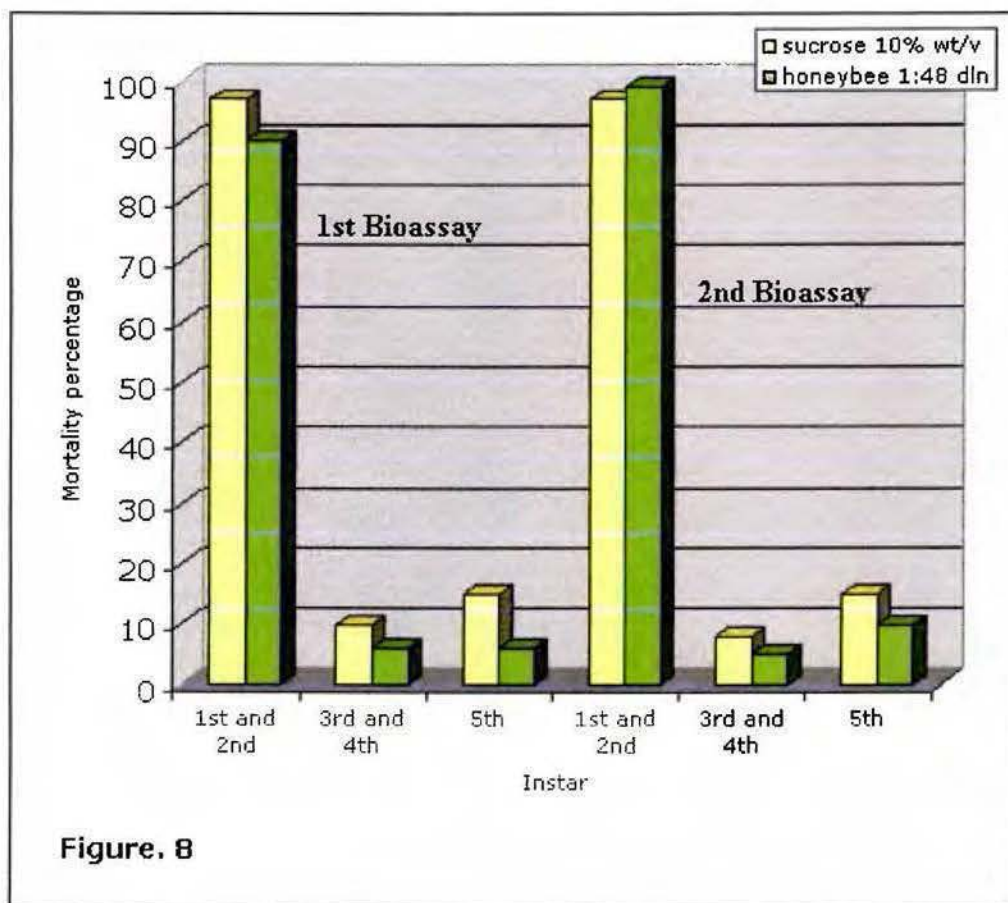


Figure 7.



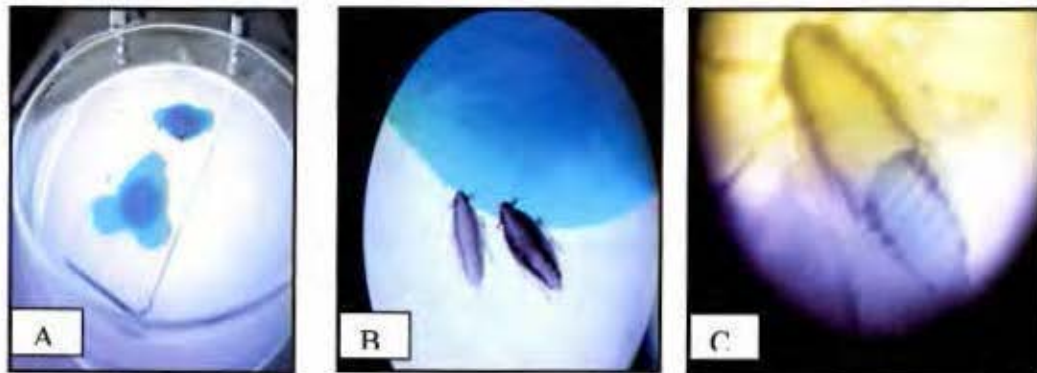
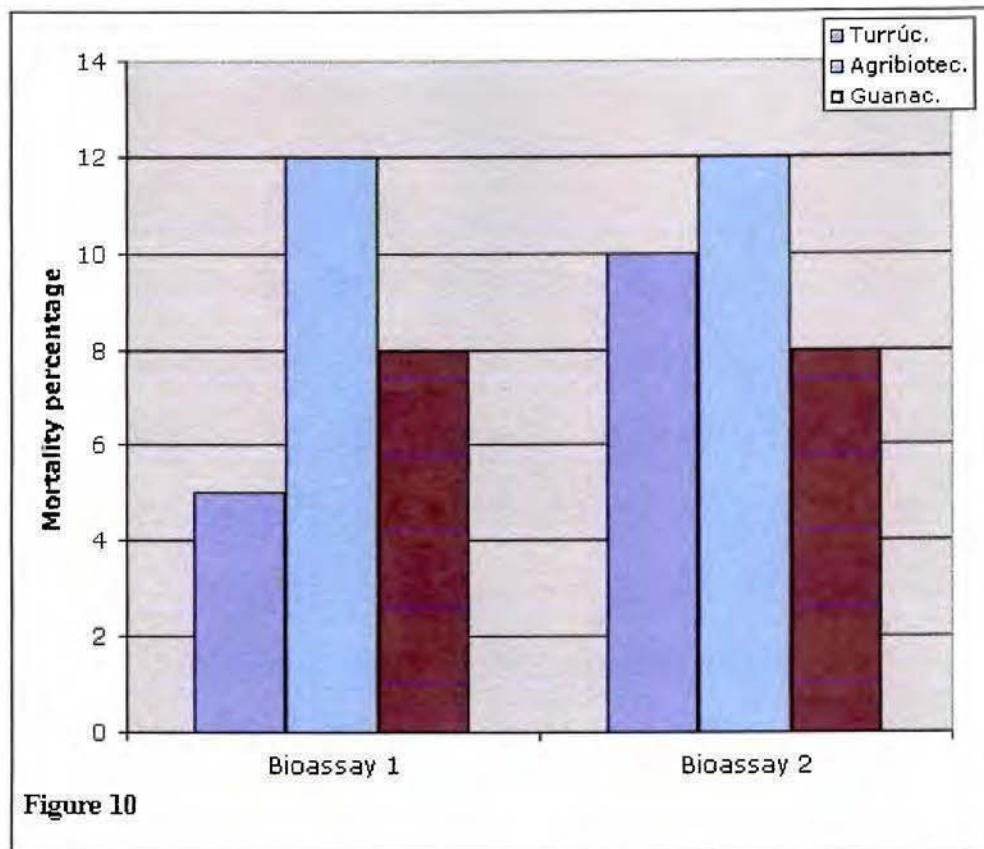


Figure. 9



CAPITULO 5

Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Costa Rican strains toward the rice pest, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera:Delphacidae), using a novel feeding bioassay system

Rebeca Mora¹ and Ana M. Espinoza^{1,2}

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

Toxicity of *Bacillus thuringiensis* Costa Rican strains toward the rice pest, *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera:Delphacidae), using a novel feeding bioassay system

Rebeca Mora¹ and Ana M. Espinoza^{1,2}

¹Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Ciudad de la Investigación, Universidad de Costa Rica, Sabanilla de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

²Escuela de Agronomía, Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica, San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica.

KEY WORDS: *Tagosodes orizicolus*, Homoptera, bioassay, *Bacillus thuringiensis*

ABSTRACT

Tagosodes orizicolus (Homoptera:Delphacidae) is an important rice pest that causes severe damage to the plant by feeding and oviposition. The most common method of control is the use of synthetic insecticides that are highly toxic to humans and hazardous to the environment, particularly to natural enemies of *T. orizicolus*. Therefore, it is necessary to explore alternative methods to diminish the populations of this insect, based on the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*, which is innocuous to humans and to the environment. The purpose of this research is to perform bioassays to evaluate the toxic effect of a collection of *Bt* strains, isolated from Costa Rican natural and agricultural ecosystems, on the planthopper *T. orizicolus*. Twenty-seven *Bt* strains were

evaluated on coarse bioassays, using as the inoculum, three bacterial loops of fully sporulated cultures (approximately a 0.444-0.666 mg/ml concentration): two strains from protected areas, 18 isolated from homopteran species from agroecosystems and the strains HD1, HD125, HD137, *Bti*, *Btt*, as well as the Mexican stains GP3 and GP43. Eight of these strains showed higher mortalities from the one observed in the control. When coarse bioassays using lyophilized spores and crystals (1mg/ml solution in a final volume of 9ml) were performed with these eight strains, six presented mortalities over 70% (*Bti*, HD1, GP43, 40-X-m, 26-O-To and 23-O-To). Of these, the latter two strains were isolated from homopterans. The *cry1*, *cyt* and *vip* genes were present in those strains that exhibited higher toxicity, with the exception of *Bti*. Mortalities of 10% were observed in all the controls.

INTRODUCTION

Most *Bacillus thuringiensis* strains are active against insects of the orders Lepidoptera, Diptera and Coleoptera. However, a few *Bt* strains have been found to be toxic to Hymenoptera, Orthoptera and Mallophaga (Glare y Callaghan, 2000). In addition, *in vitro* union assays and histopathological studies of *Bt* δ -endotoxins have been performed on insects with chewing mouthparts, such as the larvae of the lepidopterans, like *Manduca sexta*, *Plutella xylostela*, *Bombix mori*, *Heliothis virescens* (Bravo *et al.*, 1992a and 1992b, Endo and Nshiitsutsuji-Uwo, 1980).

However, there are only two reports of toxic δ -endotoxins for Homoptera, both of them in Aphididae, such as *Rhopalosiphum* spp. and *Myzus persicae* (Walters and English, 1995). In addition, there are apparently two highly toxic *Bt* strains against the white fly *Bemisia tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae) (Bravo, personal communication). The order Homoptera includes small sucking insects, and within this order, the family Delphacidae includes more than 20000 species classified in 300 genera. The feeding preferences, sap

sucking habit, oviposition behavior and virus transmission ability have contributed to making this family among the most economically important pests of crops like maize, sugar cane, rice and other cereals.

The monophagous rice species *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera:Delphacidae) is distributed in the tropics and subtropics of the American continent. This insect causes direct damage to the rice plant during feeding and oviposition, and it is the vector of the rice hoja blanca virus (RHBV) (Orellana, 1981). *T. orizicolus* feeds through its stylets, specialized mouthparts that allow the insect to reach the phloem of the vascular bundles. However, this feeding habit makes it difficult to perform bioassays to evaluate the toxicity of suspensions of spores and crystals of *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Nevertheless, a reproducible bioassay was developed for *T. orizicolus* that consists of a feeding system through Parafilm membranes using sugar solutions (Mora and Espinoza, 2003. Unpublished).

For the analysis of a collection *Bt* strains of unknown toxicity, it is necessary to perform first coarse bioassays with the species of interest, using a non-purified inoculum to analyze qualitatively the toxicity of the *Bt* strains (Glare and Callaghan, 2000). This methodology allows one to discard the strains with no toxic effect and select those with positive effect. Later, these strains can be re-analyzed through semi-fine bioassays using more than one concentration of spore and crystal lyophilized suspensions. Finally, fine bioassays should be done with purified crystals of the strain.

In this research, the toxicity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from different Costa Rican ecosystems, was evaluated using *T. orizicolus* coarse bioassays in a sugar feeding system, through Parafilm membranes. The bioassays demonstrated that several *Bt* strains showed toxicity against *T. orizicolus*.

MATERIAL AND METHODS

Inoculum preparation: The following *Bacillus thuringiensis* strains were tested: *Bti*, *Btt*, HD1, HD125, H137 (strains provided by Daniel R. Zeigler, The *Bacillus* Genetic Stock Center; Department of Biochemistry, Ohio State University), GP3 and GP43 (strains provided by Alejandra Bravo, Institute of Biotechnology, Cuernavaca, México) and the following 20 native Costa Rican strains: CIBCM166, CIBCM376 (isolated from protected areas) and 24-P-t0, 1-O-to, 23-O-to, 20-O-to, 18-O-to, 26-O-To, 38-O-to, 44-O-to, 33-O-to, 31-F-c, 14-F-c, 37-X-m, 40-X-m, 22-X-m, 5-X-m, 4-I-to, 43-S-d and 34-S-d (isolated from homopteran insects). These strains were inoculated on Petri dishes with solid Agar-LB medium and incubated for approximately four days at 30°C until autolysis was reached.

Bioassays: The liquid diet consisted of a 1:48 vol/vol dilution of honeybee in sterile water. The inoculum of the first coarse bioassay consisted of three bacterial loops of the bacterial culture fully sporulated added to 9 ml of the diet solution (approximately a 0.444-0.666 mg/ml concentration) and homogenized using a vortex. The inoculated diet was placed into sterile Petri dishes of 6cm in diameter and covered by a stretched Parafilm membrane that was perforated 50 times using a sterile dissection needle (N°0). The sealed plate was then introduced in to a larger Petri dish (10 cm diameter) and the insects added using a manual suction trap. The second coarse bioassay was performed using the same conditions, but, the inoculum consisted of lyophilized spores and crystals used to make a 1mg/ml solution in a final volume of 9ml. These were obtained by collecting three four-day-old fully sporulated bacterial cultures from Petri dishes, then adding sterile cold distilled water and by centrifuging three times at 7000 rpm in a clinical centrifuge (IEC). The pellet was stored at -20C for two hours and lyophilized (model LABCONCO, Lyph-Lock 12). All the bioassays consisted of three repetitions per treatment and, according to insect availability, each treatment included between 20 and 30 third and fourth instar nymphs. A negative control was also included, which consisted of only sugar diet. The bioassays were performed in a growth chamber (White Westinghouse, model 624) with temperatures between 29°C±0.1 during the day and 19°C±0.1 at night, a relative humidity of 80%±0.1 and 12 hours light photoperiod. The mortality percentage of all the strains in all the

bioassays made, was corrected using the Abbott Formula (corrected mort. %=strain mort. %-neg. control mort./100-neg. control mort.%) according to the mortality percentage observed in the controls.

PCR and product analysis: For DNA extraction, the protocol described by Chen and Kuo (1993) was used. DNA concentration was estimated by fluorometry (Quantech®, model FM1 109535). The primers used were those reported for the following gene families: *cryI* (*cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIAd*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE* and *cryIF*), *cry3-cry7*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cyt* (Bravo *et al.*, 1998), *vip1*, *vip2* and *vip3* (Bravo, personal communication). For PCR analysis, the following reaction mixture was used: 25mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 20μM primers and 2,5 U *Taq* polymerase in a total volume of 25 μL. Four microliters of sample DNA (10ng/ul) were also used. The amplification program consisted of the following: a denaturing step of 2 min. at 95°C, followed by 30 cycles of 1 minute at 95°C, 1 minute at 72°C and 1 minute at 72°C, and a final extension step at 72°C for 5 minutes. The PCR products were analyzed in 1% agarose gels.

RESULTS

In every coarse bioassay performed with the strains of *Bt* 50 untreated insects were included as controls. A total of approximately 2000 insects were tested as negative controls, in which mortalities of 10% or less were obtained (4.85±1.86). In Table 1, it is shown that as a result of the first coarse assay (using three bacterial loops of the bacterial culture fully sporulated added to the 9 ml of the diet solution, approximately a 0.444-0.666 mg/ml concentration) the strains GP3, Btt, HD125, CIBCM166, CIBCM376, 34-S-d, 4-I-to, 18-O-to, 20-O-to, 15-P-to, 38-O-to, 44-O-to, 22-X-m, 33-O-to, 1-I-to, 37-X-m, 24-P-to, 5-X-m and 31-F-c do not have an effect on *T. orizicolus*. These strains showed mortality percentages between 0% and 8.8%, similar to that of the controls. In addition, the strains 26-O-to, 40-X-m, HD137, HD1, GP43 and Bti, showed mortality percentages of 12.2%, 16.6%, 17.7%, 22.2%, 22.2%, 22.2%, respectively, whereas the strains 43-S-d and 23-O-to, presented mortalities of 33% and 44%, respectively. The first group described showing mortalities between 12.2% to 22.2% included predominantly strains with *cryI*, *cyt* and *vip*

genes. Furthermore, the second group with the higher mortalities (33%-44%) contained strains that did not amplify with any of the primers used. It is important to mention that the strains that did not have an effect on *T. orizicolus* presented mostly *cry 3* and *cry 7* genes.

Eight strains were evaluated in coarse bioassays using lyophilized spores and crystals (1mg/ml solution in a final volume of 9ml) (Table 2). Six out of eight strains evaluated: GP43, Bti_{23-O-to}, HD1, 26-O-to and 40-X-m, showed a toxic effect to *T. orizicolus* resulting in mortality percentages above 74%.

DISCUSSION

The mortality percentages of the controls observed in the coarse bioassays, show that the results among bioassays are highly reproducible. This reproducibility indicates that any increase in mortality above ten percent, in the semi-fine bioassays, is due to the toxic effect of the *Bacillus thuringiensis* crystal proteins or to a synergistic effect of the spore and the crystal proteins. However, the latter should be analyzed in semifine bioassays and later in fine bioassays using purified crystals. It is important to mention that in order to eliminate the toxic effect of the β -exotoxin (since it could be present in some of these strains) in the coarse bioassays, the spore and crystal suspensions were centrifuged before incorporating them into the diet.

It is important to stress that most of the *cry1* genes described are toxic to Lepidoptera; however, there are strains that have *cry1* genes that show toxicity to homopterans. Such is the case of the Mexican strain GP3, which has the genes *cry1A*, *cry1B*, *cry1C* and *cry1D*, and apparently shows toxicity to *Bemissia tabaci* (Bravo, personal communication). Also, in this investigation we report that the strains 40-X-m, HD1, and GP43 presented mortality percentages above 80% and amplified with the *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac* and *cry1Ad* genes. In addition, there are other genes within the

cry1 family, such as *cry1I* and *cry1K*, which have a dual effect against Lepidoptera and Coleoptera (personal communication A. Bravo). Due to the fact that there are no known toxic *Bt* strains against *T. orizicolus*, the selection of the strains that were evaluated in the bioassays with this species was not oriented towards strains with a particular genetic profile, but involved a wide diversity of *Bt* genes, since any strain could be potentially toxic. For example, mortality close to 100% observed with the *Bti* strain in coarse bioassays, show that a mosquitocidal strain was toxic to *T. orizicolus*. This toxicity could be due to the effect of one or several Cry proteins that have been reported in this strain: Cry4a, Cry4b, Cry 11, Cyt1a and Cyt2a (Crickmore *et al*, 1995). In addition, aside from the *Bti* strain, it was observed that the strains with high toxicity predominantly had the genes *cry1*, *cyt*, *vip* or other unknown genes, in contrast to the strains that contained the *cry3* and *cry7* genes, which did not show toxic effect.

The coarse bioassay proved to be effective for a rapid screening of the strains. It is important to mention that, although a relatively high bacterial inoculum was incorporated in the coarse bioassay using three bacterial loops, the mortality values, between 90% and 100%, expected in this type of assay using the concentrations that we incorporate (0.444 mg/ml-0.666 mg/ml) were not observed. In this case, the mortality percentages did not exceed 44%. If these results were obtained in coarse bioassays using mosquitoes, these strains would have been rejected, since mosquitoes, in similar bioassays, are very susceptible and require lower concentrations of inoculum (0.111 mg/ml) to obtain 100% mortality (personal communication Dr. Ibarra). However due to the sucking feeding habit of *T. orizicolus*, the unknown interactions of *Bt* with this species and lack of information about the activation process within the homopteran digestive tract, it is possible that this homopteran can not adequately process the crystal and dissolved and tripzinized toxins should be tested. There is also the probability that this species has the ability to process the crystal, but due to its sucking feeding behaviour and the fact that many sucking insects ingest and rapidly excrete large volumes of their liquid diet, reducing midgut residence of toxins (Walters and English, 1995), greater concentrations of toxin may be needed.

The fact that the strain GP3, which is apparently toxic to *B. tabaci* (Homoptera:Aleyrodidae), did not exhibit toxicity on *Tagosodes orizicolus* (Homoptera:Delphacidae), supports the results observed in numerous studies which have demonstrated that *Bt* toxicity on a particular insect species does not ensure a toxic effect on related species (Glare and Callaghan, 2000). On the other hand, strains that have been reported to be active against a particular insect order could also be toxic against other orders. Furthermore, most *Bt* strains show toxicity against a few insect species (Glare and Callaghan, 2000), thus insect susceptibility towards *Bacillus thuringiensis* should be studied case by case.

Due to the feeding habit of the sap-sucking insects, it was interesting to discover *Bt* strains toxic to homopterans. When feeding behaviour is analyzed, questions on how the insect comes in contact with the bacteria in the environment are raised. Significant differences exist with chewing insects, which constantly ingest large quantities of leaves, which can be contaminated externally with *Bt*. Insects like *T. orizicolus*, in contrast, only feed on phloem sap of the plant. It is interesting to mention that in a previous study, it was observed that *T. orizicolus* is able to ingest solutions without the need of perforating artificial membranes, suggesting this feeding behaviour as a possible route for ingesting *Bt* contaminated liquids (Mora and Espinoza, unpublished).

It is important to analyze, in fine bioassays the toxic effect of the purified cry proteins. For plant transformation it would be interesting to determine which Cry protein (s) are responsible for the toxic effect and then select the gene(s) that code for the δ -endotoxins in the strains 26-O-to, 40-X-m, GP43, 23-O-to, HD1 and Bti. Also, if the majority of strains showed mortality percentages near 100% using only very high concentrations, as the five strains reported in this investigation, chloroplast transformation could be considered, since expression of foreign genes via plastid genomes dramatically enhances the level of expression (Daniell *et al.*, 2002).

It is important to increase the toxicologic characterization of the remaining strains of the *Bt* collection, especially those that present the *cryI*, *vips* and *cyt* genes to find other

effective *Bt* strains against *T. orizicolus*. The discovery of Cry and Vip proteins that are toxic to Homoptera is important in understanding the interaction of the *Bt* δ -endotoxins with the gut of the sap-sucking insects, as well as in generating potential strategies for biological control, such as the obtaining of useful genes for plant genetic transformation. These strategies do not exclude the use of other control methods that are currently used for the biological control, such as the use of different species of parasitoids. The use of transgenic plants involves a significant reduction of synthetic insecticides, and thus the conservation of natural enemies, which are important controlling agents of *T. orizicolus* populations.

REFERENCES

- Bravo, A., S. Jansens and M. Peferoen. 1992a. Immunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *J. Invertebrate. Pathol.* 60:237-246.
- Bravo, A., K. Hendrick, S. Jansens and M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. *J. Invertebrate. Pathol.* 60:237-246.
- Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, A. Schnepf, B. Lambert, D. Lereclus, J. Baum, and D. H. Dean. 1995. Revision of the nomenclature for *Bacillus thuringiensis* pesticide *cry* genes, p. 14. *In* Program and Abstracts of the 28th Annual Meeting of the Society for Invertebrate Pathology. Society for Invertebrate Pathology, Bethesda, Md.
- Daniell, H., S. Muhammad and L. Allison. 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *Trends in Plant Science.* Vol 7, No. 2.
- Endo, Y. and Nishiitsutsuji-Uwo, J. 1980. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin: Histopathological changes in the silkworm midgut. *Journal. Invertebrate. Pathol.* 36, 90-103.
- Glare. T. and Callaghan. M. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wiley and Sons, Ltd. New York.

- Mora R. and A. Espinoza. 2003. Establishment of a novel bioassay to determine the susceptibility of *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae) to strains of the entomopathogenic bacteria *Bacillus thuringiensis*. In press.
- Orellana. P. 1981. Aspectos relacionados con la resistencia genética del arroz (*Oryza sativa*) al insecto *Sogatodes oryzicola*, hoja blanca y *Pyricularia oryzae*. Agrotecnia de Cuba. 13 (1) Pp 37-45.
- Walters. F. and English. L. 1995. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins toward the potato aphid in an artificial diet bioassay. Entomología Experimentalis et Applicata. 77: 211-216.

LEYENDS TO FIGURES

Table 1. Mortality percentage of *Tagosodes orizicolus* in coarse bioassays using three loops of fully sporulated cultures of twenty seven strains of *Bacillus thuringiensis*.

Table 2. Mortality percentage of *Tagosodes orizicolus* in coarse bioassays using liofilized spores and crystals (1mg/ml solution) of eight strains of *Bacillus thuringiensis*.

Strain	Order/species of insect from which strain was isolated	Gene profile	Mortality percentage, strain	Mortality percentage, negative control	Mortality percentage Abbott formula
Btt *1	x	cry3	10%	10%	0%
34-S-d *3	Delphacidae, alive	cry 3, cry 7 and vip 3	10%	10%	0%
4-I-to *3	<i>T. orizicolus</i> , dead	cry 3 and cry 7	10%	10%	0%
18-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	10%	10%	0%
20-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	10%	10%	0%
GP3 *2	<i>B. tabassi</i> , dead	cryIAa, cryIAb, cryIAc and cryIAD	13%	10%	3.3%
HD125 *1	X	cryIE	13%	10%	3.3%
15-P-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	15%	10%	5.5%
38-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	15%	10%	5.5%
44-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	cyt and vip3	15%	10%	5.5%
22-X-m *3	Membracidae, dead	cyt and vip3	15%	10%	5.5%
33-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	cry 3 and cry7	15%	10%	5.5%
1-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	15%	10%	5.5%
Cibcm-376 *3	Protected areas	cry3 and vip3	18%	10%	8.8%
37-X-m *3	Membracidae, dead	cry 3 y cry 7, cyt and vip 3	18%	10%	8.8%
24-P-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	cyt, vip3	18%	10%	8.8%
5-X-m *3	Membracidae, dead	cryIAa, cryIAc and vip 3	18%	10%	8.8%
31-F-c *3	Aphididae, dead	Cyt	18%	10%	8.8%
Cibcm-166 *3	X	cryIAa, cryIAb, cryIAc, cryIE and cryID	20%	10%	8.8%
26-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	cyt and vip3	21%	10%	12.2%
40-X-m *3	Membracidae, dead	cry IAa, cryIAb and cryIAc	25%	10%	16.6%
HD137 *1	X	cryIAa, cryIB and cryID	26%	10%	17.7%
HD1 *1	X	cryIAa, cryIAb, cryIAc and cry2A	30%	10%	22%
GP43 *2	<i>B. tabassi</i> , dead	cryIAa, cryIAb, cryIAc and cryIAD	30%	10%	22%
Bti *1	X	cry4 and cry11	30%	10%	22%
43-S-d *3	Delphacidae, alive	Did not amplified	40%	10%	33%
23-O-to *3	<i>T. orizicolus</i> , alive	Did not amplified	50%	10%	44%

Table. 1

*1 Provided by The Bacillus Genetic Stock Center, *2 Provided by Institute of Biotechnology (IBT), México, *3 CIBCM collection

Strains	Mortality percentage (1mg/ml), liophilized spores and crystals	Mortality percentage Abbott formula (1mg/ml), liophilized spores and crystals	Mortality percentage, negative control
26-O-to	77%	74%	10%
40-x-m	97%	96%	8%
HD137	25%	18.6%	8%
HD1	84%	83%	8%
GP43	92%	91%	8%
Bti	96%	95%	8%
43-S-d	50%	44%	10%
23-O-to	84%	82%	8%

Table 2.

CAPITULO 6

**RESUMEN DE LA METODOLOGÍA Y LOS RESULTADOS
DE LOS CAPÍTULOS II, IV y V EN ESPAÑOL
Y
DISCUSION GENERAL**

RESUMEN DE METODOLOGÍA Y RESULTADOS DE LOS CAPÍTULOS II, IV y V EN ESPAÑOL

CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

Colectas de insectos. Se colectaron insectos de las familias Aphididae, Cicadellidae, Delphacidae, Membracidae y Aleyrodidae en diversas regiones agrícolas del país. Estas familias se obtuvieron de diversas plantas hospederas como arroz, lechuga, brocoli, chile, paste, frijol y café además de diferentes zonas aledañas silvestres. La búsqueda y colecta de insectos muertos se centró en familias gregarias. Estas familias incluyeron principalmente áfidos y mosca blanca en donde los insectos se colectaron manualmente o utilizando una pajilla succionadora. Con respecto a familias no gregarias, en donde la búsqueda de insectos muertos fue más difícil, se colectaron tanto insectos vivos y muertos con una bomba de succión (Craftzman 32 cc, USA, modificada). Posteriormente, los insectos colectados fueron preservados individualmente en tubos Eppendorf con etanol al 70% a 4°C.

Aislamientos de cepas de *Bacillus thuringiensis*. Se seleccionaron los insectos pertenecientes al orden Homoptera y se clasificaron a nivel de familia o especie de ser posible. Posteriormente, grupos de 10 a 20 insectos de la misma familia y provenientes del mismo sitio de colecta se maceraron en medio LB. Al siguiente día, se inocularon en platos Petri con medio agar sólido y se incubaron a 30°C durante 4 a 5 días. Se utilizó además el protocolo de aislamiento de Travers *et al* (1987).

Microscopía de los cristales. Las colonias que presentaron una morfología típica de *Bt* se inocularon individualmente en platos con agar-LB sólido. Posteriormente, se tomó un inóculo de estas cepas purificadas (a partir de cultivos de aproximadamente cuatro días) y se realizaron observaciones al microscopio de luz (Nikon eclipse E-200) utilizando láminas teñidas con cristal violeta o azul de Coomasie. Para realizar las observaciones en microscopio electrónico, suspensiones diluidas de esporas y cristales se colocaron en bases

de aluminio y se secaron a temperatura ambiente. Las muestras se cubrieron con oro (Fullam EMS-76M) por 5 minutos. Se analizaron en un microscopio Hitachi S-2360N a 10-15 KV y se observaron a 2000 y 24000X aumentos.

Conservación de las muestras. Las cepas de *Bt* esporuladas se congelaron a -70°C con glicerol estéril (1 parte de glicerol y 1 parte de LB). Además, se tomó una asada y se resuspendió en 100 μl de agua estéril, impregnándose papeles de filtro estériles con esta suspensión de esporas y cristales. Posteriormente, se dejaron secar y se guardaron a temperatura ambiente para su conservación a largo plazo.

Electroforesis de proteínas. Las suspensiones de esporas y cristales se analizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. El peso molecular de las proteínas se estimó utilizando marcadores de peso molecular conocido (BIORAD 161-0304).

Reacción de PCR y análisis de los productos. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Chen y Kuo (1993) modificado. La concentración de ADN se estimó mediante un fluorómetro marca Quantech, modelo FM1 109535. Se utilizaron los iniciadores para la familia de genes *cryI* (*cryIAa*, *cryAb*, *cryIAC*, *cryIAd*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE* y *cryIF*), *cry3-cry7*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cyt*, *vip1*, *vip2* y *vip3* (Bravo, comunicación personal). Para el PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 25mM MgCl_2 , 10mM dNTPs, 20 μM de cada iniciador y 2,5 U de Taq polimerasa. Se agregó 4 μl de ADN en muestras con una concentración 10ng. Se utilizó el siguiente programa para el termociclador: un primer ciclo de 2 minutos a 95°C , 30 ciclos de 1 minuto a 95°C , 1 minuto a 52°C , 1 minuto a 72°C , y un último ciclo de 5 minutos a 72°C . Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a 1%.

RESULTADOS

Se colectaron aproximadamente 1300 insectos de diferentes familias del orden Homoptera a partir de 10 ecosistemas diferentes: plantaciones de arroz, lechuga, brócoli, frijol, paste, café, chile, además de algunas zonas silvestres y a partir de las colonias en el invernadero del CIBCM. A partir de 120 grupos de insectos macerados se aisló *Bt* de 44 de ellos, obteniéndose una frecuencia de aislamiento del 40%. Al comparar el protocolo de

aislamiento de Travers *et al.* (1987) con el descrito en la metodología, se obtuvo un 2% de recuperación de *Bt* utilizando el protocolo de Travers, mientras que con el segundo protocolo el porcentaje de aislamiento fue del 30%.

El análisis de las inclusiones cristalinas de las cepas mostró una gran diversidad en la morfología, y en el tamaño de los cristales: 37 cepas presentaron cristales pleomórficos (80%), cuatro mostraron cristales pleomórficos, bipiramidales y ovalados (9%), una cepa cristales pleomórficos y bipiramidales (2%), otra pleomórficos y ovalados (2%) y dos cepas ovalados y bipiramidales (4%).

El análisis mediante SDS-PAGE de las δ -endotoxinas mostró un patrón electroforético muy diverso. Dieciseis cepas mostraron dos polipéptidos prominentes. Ciertas cepas mostraron proteínas de bajo peso molecular entre 40 y 100 KDa mientras que otras cepas mostraron proteínas de alto peso molecular las cuales oscilaron entre 60 y 175 KDa. Por el contrario, 28 cepas mostraron una sola banda, 12 cepas con proteínas de 45 Kda y 16 con pesos moleculares entre los 60 y 175Kda.

Como resultado de los PCRs 23 cepas no amplificaron con los imprimadores utilizados y 21 amplificaron con uno o más de los imprimadores para los genes *cry1*, *cry3*, *cry7*, *cyt* y *vip3*. En total la colección presenta un total de 8 perfiles genéticos. Se observa que 14 cepas amplificaron con los imprimadores para dos o más genes y seis contienen únicamente un gen. Únicamente cuatro cepas amplificaron con genes *cry1*, estas se analizaron además con imprimadores específicos para genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIAd*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIF* y *cryIE*, de los cuáles únicamente amplificaron con *cryIAa*, *cryIAb* y *cryIAc*. En la Fig. 3 se observa que de las cuatro cepas que amplificaron con *cryIAa*, dos de estas también lo hicieron con los genes *cryIAb* y *cryIAc* y una en combinación con *cryIAc* y *vip3*. Ninguna cepa amplificó con los genes *cryIAd*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIF*, *cryIE*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *vip1* y *vip2*.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

Colectas en campo. Se efectuaron colectas de *T. orizicolus* en tres zonas arroceras del país: Turrúcares, Tejar de Alajuela y Bagaces con una bomba de motor de succión (Craftzman 32 cc, USA) modificada, de forma que los insectos quedaron atrapados en un trozo de tela de tergal colocado entre las dos extensiones del ducto de succión. Se muestrearon al azar doce transectos de la plantación. El material se trasladó a bolsas plásticas, seleccionándose las ninfas y adultos de *T. orizicolus*. Posteriormente, los insectos se colocaron en jaulas (30x40x40 cm) con tres plantas de arroz de tres meses (cultivar CR 5272), provenientes de semilleros y se mantuvieron en el insectario del CIBCM (80% humedad relativa, 18°C a 35°C de temperatura).

Establecimiento de colonias de *T. orizicolus*. Los insectos se mantuvieron en jaulas de 30 cm de ancho, 40 cm de altura y 40 cm de profundidad, cubiertas por un cedazo fino para la obtención de progenie. Se sometieron a un período de cuarentena durante al menos dos ciclos de multiplicación, con el fin de eliminar parasitoides, depredadores y hongos entomopatógenos. Las jaulas se monitorearon de día por medio para eliminar arañas, hormigas, chinches y parasitoides que pudieran afectar las crías. Cada jaula contenía un máximo seis plantas de las variedades CR-5272 y CR-1821 de 4 meses de edad, sembradas en macetas de plástico de 250 mL con suelo abonado (1/3 de Vermicompost y 2/3 de granza). Las plantas se deshierbaron semanalmente eliminándose manualmente las láminas foliares viejas, asimismo sustituyéndose las plantas más viejas por jóvenes y vigorosas. Las plantas se regaron de día por medio y se mantuvieron a capacidad de campo. Para la obtención de réplicas de las colonias ya establecidas se tomaron 30 ninfas de cuarto o quinto estadio y se colocaron en potes de 250 mL con cuatro plantas de cuatro meses edad tapadas por una botella de un litro de plástico con entradas de aire selladas con malín hasta que se observó la progenie (aproximadamente 22 días). Cuando la progenie estuvo en el

tercer estadio de desarrollo se trasladó a jaulas con las dimensiones y bajo las condiciones anteriormente mencionadas.

Alimentación a través de membranas de Parafilm. Se utilizaron membranas de Parafilm estiradas cuatro veces en ambos sentidos para sellar los diferentes recipientes a evaluar. Se utilizaron tubos Eppendorf de 1,6 ml invertidos a los que se les hizo tres agujeros los cuales se recubrieron con membranas de Parafilm. Posteriormente, estos viales se llenaron con la solución azucarada y se sellaron. Finalmente, este tubo se introdujo en un vial con los insectos. También se probaron viales de vidrio de aproximadamente 10 mL, los cuales se llenaron con solución azucarada, se sellaron con Parafilm y se invertieron sobre un recipiente de plástico de 20 ml de volumen con un agujero en la tapa. Los insectos se anadieron por un agujero posteriormente sellado con algodón. Por último, se utilizaron platos Petri estériles de 6 cm de diámetro, los cuales se llenaron con la solución azucarada y se cubrieron con Parafilm. Posteriormente, los Petri se introdujeron en otro Petri de 15 cm de diámetro con un papel filtro en la base. Finalmente, los insectos se incorporaron mediante una pajilla succionadora. Se probaron soluciones de sacarosa al 5, 10 y 20%, autoclavadas durante 20 min a 121°C. También, se analizó el efecto de perforar las membranas de Parafilm con una aguja de disección número 0. Asimismo, se evaluó el sistema de membranas anteriormente mencionado pero utilizando como dieta líquida miel de abeja diluida 1:48 en agua estéril. Todos estos experimentos se realizaron en una cámara de crecimiento White Westinghouse, modelo 624 cuyas fluctaciones en las variables son de 18°C±0,1 de noche y 28°C±0,1 de día, 80% de humedad relativa y un fotoperíodo de 12 hora luz. Se evaluaron además los estadios ninfales de *Tagosodes orizicolus* para determinar el porcentaje de mortalidad al alimentarse de las dietas a través de membranas de Parafilm. Se realizó también un experimento para determinar si el insecto se alimenta directamente, en ausencia de una membrana de Parafilm.

Efecto del origen de la colonia sobre la mortalidad natural de *T. orizicolus* Se realizaron bioensayos con las poblaciones de Turrúcares, Tejar y Guanacaste para observar si había diferencias entre la mortalidad de las poblaciones según su procedencia. Se utilizó como dieta líquida sacarosa al 10%. Los bioensayos consistieron de cuatro repeticiones por población cada una con seis ninfas del cuarto estadio. Se determinó la mortalidad a las 72 horas de iniciado el experimento. Cuatro bioensayos se realizaron en el cuarto de

crecimiento del CIBCM con un fotoperíodo de 12 horas luz, con una luminosidad de $592 \pm 2,76$ Lux, sin temperatura ni humedad controladas y el resto de los bioensayos se realizó en la cámara de crecimiento bajo las condiciones antes descritas.

RESULTADOS

Se establecieron tres colonias de *Tagosodes orizicolus* provenientes de Bagaces, Turrúcares y Tejar de Alajuela. La colonia de Bagaces se inició en el mes de mayo del 2001 y actualmente cuenta con un número aproximado de diez generaciones, la de Tejar de Alajuela se inició en agosto del mismo año con un aproximado de cinco generaciones y la de Turrúcares un mes después, con cuatro generaciones. Se encontró que los insectos provenientes de campo debían someterse a cuarentena para detectar la presencia de quistes del parasitoide *Haplogonatopus hernandezae* (Hymenoptera: Dryinidae) en ninfas y hembras adultas principalmente. También fue frecuente la incidencia de chinches de la familia Reduviidae, los que depredaban estadios inmaduros y adultos de *T. orizicolus*. Las dos plagas se controlaron eliminando manualmente los adultos del chinche y los delfácidos parasitados. Posterior a la cuarentena se presentó depredación por hormigas y por el chinche *Cyrtorhinus lividipennis* Reuter. Las hormigas se controlaron poniendo potes con agua en la base de las jaulas y colocando en las cercanías de las colonias ácido bórico. Preliminarmente, *C. lividipennis* se eliminó manualmente, sin embargo, luego se determinó que los huevos de *T. orizicolus* eran depredados por ninfas del chinche recién eclosionadas. Se observó además, que *C. lividipennis* oviposita huevos de apariencia similar a los de *T. orizicolus* en las hendiduras de las venas de las hembra de este delfácido. Por esta razón, el control más eficiente para este hemíptero fue evitar la colonización por *C. lividipennis* al cubrir con plástico las plantas del semillero libres de este insecto. Además en las colonias con alta densidad de insectos se observó la presencia del hongo fumagina, sin embargo este no afecta directamente a *T. orizicolus*, pero sí la calidad nutricional de la planta.

Se realizaron cuatro bioensayos para determinar la concentración óptima de sacarosa (5%, 10% y 20%), en un sistema de alimentación a través de membranas de

Parafilm. Cada bioensayo consistió de 3 repeticiones con 12 ninfas de quinto estadio, determinándose la mortalidad al sexto día. Se observó que la concentración de sacarosa al 10% registró mortalidad menores que la sacarosa al 5% y 20% en los cuatro bioensayos, obteniéndose mortalidades iguales o inferiores al 10% en todos los bioensayos ($X^2=15.223$, $P=0.000$, g.l.=3, $N=120$).

En los experimentos para determinar el sistema de alimentación más eficiente se obtuvo que el mejor tratamiento fue el de los platos Petri ya que la mayoría de los insectos sobrevivieron por 14 días. En los viales invertidos los insectos se alimentaron ocasionalmente, sobreviviendo solo 48 horas y en los tubos Eppendorf no se alimentaron y murieron en menos de 24 horas. En un experimento posterior se determinó el efecto de aumentar la turgencia de la dieta líquida en el plato Petri, adicionándose más dieta con una jeringa, no observándose diferencias entre ambos tratamientos ($X^2=0.827$, $P=0.363$, g.l.=1, $N=80$).

En otros experimento se incorporó a la dieta azucarada un colorante natural verde de cocina como atrayente, sin embargo, no se observaron diferencias entre el tratamiento con y sin tinte ($X^2=2.857$, $P=0.091$, g.l.=1, $N=60$). Por el contrario, se observó un aumento de hongos contaminantes en la dieta con colorante. Se probó luego una solución diluida de miel de abeja como alternativa a la dieta de sacarosa. Al comparar la dieta de sacarosa con la dieta que contenía miel se observó que en tres bioensayos el tratamiento con miel presentó una mortalidad inferior al 5% y en otro fue nula. Por el contrario, con la dieta de sacarosa en dos bioensayos se observaron porcentajes de mortalidad del 10% y en dos fue de 15 y 20%.

Al realizar 3 bioensayos cada uno con 3 repeticiones de las dietas de sacarosa y miel y utilizándose 15 insectos de tercero a cuarto estadio ninfal, durante 18 días, se observa como el patrón de sobrevivencia fue similar para ambos tratamientos, sin embargo, el porcentaje de mortalidad de *T. orizicolus* fue generalmente menor al alimentarse con miel. Esta diferencia fue más evidente durante los días 1, 2 y 3 del ensayo y en los días 16, 17 y 18.

Se realizaron 3 tratamientos para determinar el estadio óptimo de *T. orizicolus* para el bioensayo: un tratamiento utilizó ninfas de primer a segundo estadio, otro ninfas de tercer y cuarto estadio y el último ninfas de quinto estadio. En el experimento se probaron las dietas de sacarosa y miel, utilizándose de 10 a 14 ninfas, repitiéndose dos veces y determinándose el número de insectos muertos al sexto día. Con insectos de primero y segundo estadio se registra casi un 100% de mortalidad desde el segundo día en ambas dietas, en el tercer y cuarto estadios al igual que en el quinto, todos los insectos que sobrevivieron mudaron a adultos. Sin embargo, en el cuarto estadio se observaron mortalidades inferiores al 10% en ambos bioensayos mientras que en el quinto estadio los valores de mortalidad son ligeramente menores o iguales al 10%. Por lo tanto, en todos los estadios el porcentaje de mortalidad es diferente y menor al utilizar la miel ($X^2=8.665$, $P=0.003$, g.l.=1, $N=200$). Asimismo, los resultados indican que el porcentaje de mortalidad es diferente para cada estadio de *T. orizicolus* ($X^2=76.312$, $P=0.000$, g.l.=3, $N=150$), siendo las ninfas de tercero y cuarto estadio las de mayor sobrevivencia en el bioensayo control.

Con respecto a los experimentos para corroborar si *T. orizicolus* se alimenta de la dieta suministrada y si este insecto requiere insertar sus estiletes a través de una membrana para alimentarse, se obtuvieron los siguientes resultados: *T. orizicolus* se alimentó de gotas de dieta de sacarosa al 10% teñida, sobreviviendo durante una semana. Surgió entonces, la idea de perforar con agujas de disección el Parafilm con el fin de favorecer la alimentación del insecto. Efectivamente, al realizar pequeñas perforaciones con la aguja de disección hay una disminución significativa en el porcentaje de mortalidad de *T. orizicolus* al alimentarse de sacarosa al 10% durante el bioensayo ($X^2=13.636$, $P=0.000$, g.l.=3, $N=150$).

Se realizaron seis bioensayos para determinar si existen diferencias en el bioensayo control entre las poblaciones de insectos provenientes de colonias de tres localidades. Con respecto a los bioensayos realizados bajo condiciones climáticas no controladas, la población de Guanacaste mostró porcentajes de mortalidad inferiores al 10% en dos bioensayo, sin embargo en otros dos el porcentaje de mortalidad fue cercano al 30%. La

población de Tejar mostró mortalidades del 10 y 20% mientras que en el bioensayo tres presentó valores cercanos al 35%. La población de Turrúcares mostró en los bioensayo uno al cuatro porcentajes de mortalidad del 20%, 30%, 50% y 30% respectivamente. Las mortalidades más bajas para las tres poblaciones se obtuvieron en el bioensayo uno y las más altas en el bioensayo tres. Debido a que en los bioensayos descritos se observó poca reproducibilidad en la mortalidad registrada, se utilizó una cámara de crecimiento para controlar las condiciones ambientales. Se logró reproducibilidad de los experimentos bajo condiciones controladas, reduciéndose significativamente la mortalidad a valores cercanos al 10%, no encontrándose diferencias significativas entre poblaciones.

CAPÍTULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del inóculo bacteriano de las cepas de interés. Se evaluaron las cepas Bti, Btt, HD1, HD125, HD137 (donadas por Dr. Daniel Zeigler, The Bacillus Genetic Stock Center) asimismo las cepas GP3 y GP43 (IBT, Cuernavaca México) y 20 cepas nativas costarricenses, dos aisladas de zonas protegidas: CIBCM 166, CIBCM 376 y dieciocho aisladas de homópteros vivos y muertos: 24-P-to, 1-O-to, 23-O-to, 20-O-to, 18-O-to, 26-O-To, 38-O-to, 44-O-to, 33-O-to, 31-F-c, 14-F-c, 37-X-m, 40-X-m, 22-X-m, 5-X-m, 4-I-to, 43-S-d, 34-S-d. Las cepas se inocularon en platos con agar sólido incubándose por cuatro días a 30°C.

Bioensayos. Se utilizó una dieta líquida que consistió en una solución de miel de abeja diluida en agua estéril 1:48 vol/vol. El primer bioensayo burdo consistió en tomar tres asadas bacterianas del cultivo las cuales se agregaron a 9 ml de la solución azucarada de miel (0.666 mg/ml). Esta mezcla se vertió en platos Petri estériles de 6 cm de diámetro. Posteriormente, se colocó una lámina de Parafilm estirada sobre el Petri sellando toda la superficie. La membrana se perforó 50 veces utilizando una aguja de disección estéril número 0. El plato sellado se introdujo en un segundo Petri de 10cm de diámetro y se introdujeron los insectos por medio de una pajilla succionadora. El segundo bioensayo burdo consistió en tomar esporas y cristales liofilizados para obtener una solución final de 1 mg/ml en un volumen total de 9 ml. Este bioensayo se realizó empleando las mismas condiciones y recipientes que el primer bioensayo. Este liofilizado se obtuvo lavando el cultivo esporulado de tres platos Petri con agar de 4 días varias veces con agua destilada fría en una centrífuga clínica IEC a 7000 rpm. Todos los bioensayos realizados constaron de dos repeticiones por cepa y según la disponibilidad de los insectos cada tratamiento incluía 20 a 30 ninfas de tercero a cuarto estadio. Además, los bioensayos contaron con un control negativo el cual consistió en utilizar la dieta azucarada sin inóculo bacteriano. Los bioensayos se realizaron en una cámara de crecimiento marca White Westinghouse,

modelo 624 cuyas fluctaciones en las variables son de $\pm 0,1$ para la temperatura (29°C de día y 19°C de noche) y de $\pm 0,1\%$ para la humedad relativa (80%) con un fotoperiodo (12 hora luz, 12 horas oscuridad). El porcentaje de mortalidad obtenido al realizar los bioensayos con las cepas de Bt fue corregido empleando la fórmula de Abbott (mort. correg.= % mort cepa-% mort control neg/100-% mort cont neg).

Reacción de PCR y análisis de los productos. Para la extracción de ADN se utilizó el protocolo descrito por Chen y Kuo (1993) modificado. La concentración de ADN se estimó mediante un fluorómetro marca Quantech, modelo FM1 109535. Se utilizaron los iniciadores para la familia de genes *cryI* (*cryIAa*, *cryAb*, *cryIAc*, *cryIAd*, *cryIB*, *cryIC*, *cryID*, *cryIE* y *cryIF*), *cry3-cry7*, *cry8*, *cry11*, *cry12*, *cry14*, *cyt*, *vip1*, *vip2* y *vip3* (Bravo, comunicación personal). Para el PCR se utilizaron las siguientes condiciones: 25mM MgCl₂, 10mM dNTPs, 20μM de cada iniciador y 2,5 U de Taq polimerasa. Se agregó 4μl de ADN en muestras con una concentración 10ng. Se utilizó el siguiente programa para el termociclador: un primer ciclo de 2 minutos a 95°C, 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 52°C, 1 minuto a 72°C, y un último ciclo de 5 minutos a 72°C. Los productos de PCR se analizaron por electroforesis en geles de agarosa a 1%.

RESULTADOS

En esta investigación todos los bioensayos burdos realizados con las cepas incluyeron un control negativo, lo que indica que se probaron un total de aproximadamente 1000 insectos de los cuáles se obtuvo una mortalidad igual o inferior al 10% (4.85±1.86). En el bioensayo burdo con tres asadas de inóculo, las cepas GP3, Btt, HD125, CIBCM166, CIBCM376, 37-X-m, 22-X-m, 33-O-to, 34-S-d, 24-P-to, 44-O-to, 4-I-to, 5-X-m, 31-F-c, 15-P-to, 18-O-to, 38-O-to, 20-O-to y 1-I-to no presentaron un efecto tóxico sobre *T. orizicolus*. Por otra parte, las cepas HD1, Bti, GP43, HD137, 26-O-to, 40-X-m, 43-S-d y 23-O-to presentan porcentajes de mortalidad mayores al control. Asimismo, las cepas 23-O-to y 43-S-d presentaron los porcentajes de mortalidad más altos de 33% y 44% respectivamente.

El grupo de cepas que presentó porcentajes de mortalidad entre 12.2% y 22.2% incluyó principalmente cepas con los genes *cryI*, *cyt* y *vip*. Por otra parte, el grupo que exhibió mortalidades más altas (33%-44%) presenta cepas que no amplificaron con ninguno de los imprimadores usados. Es importante mencionar también que las cepas que contenían genes *cry 3* y *cry7* no presentaron efecto tóxico contra *T. orizicolus*.

Ocho cepas fueron evaluadas en bioensayos burdos utilizando esporas y cristales liofilizados. Seis de la totalidad de las cepas: GP43, Bti, 23—to, HD1, 26-O-to y 40-X-m, mostraron un efecto tóxico contra *T. orizicolus* dando como resultado porcentajes de mortalidad superiores al 74%.

DISCUSION GENERAL

Como resultado de esta investigación se obtuvo un importante avance en cuanto al establecimiento de una metodología de bioensayo para *Tagosodes orizicolus* que podría probarse para otros insectos chupadores. El sistema *in vitro* de alimentación establecido permitió evaluar la toxicidad de cepas de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* contra *T. orizicolus*. Se obtuvo además una diversa colección de cepas aisladas a partir de homópteros vivos y muertos que se caracterizó en cuanto a la morfología de los cristales, pesos moleculares de la toxinas y genes cry que contienen. Seis cepas de *Bt* presentaron potencial para el control de *T. orizicolus* ya que resultaron tóxicas para este delfácido, al evaluarse mediante bioensayos burdos. Todos los resultados anteriores permitirán la búsqueda de nuevas alternativas de control amigables al ambiente para este importante insecto plaga del arroz

El control biológico de insectos de importancia agrícola, forestal, doméstica y de salud pública ha tomado gran auge en los últimos 20 años. Las estrategias biológicas de control permiten mantener las poblaciones de insectos a niveles tolerables sin alterar el equilibrio natural de los ecosistemas. El control microbiano de artrópodos y otros invertebrados ha adquirido gran importancia entre otros por la factibilidad de producir dichos microorganismos industrialmente.

Bt constituye una de las alternativas de control biológico más usado a escala mundial, desafortunadamente ciertas ventajas de esta bacteria como su espectro de acción limitado y biodegradabilidad en el ambiente, son también desventajas de los productos formulados a base de esta bacteria. Los bioinsecticidas a base de *Bt* constituyen así una alternativa sostenible e integral por no presentar efectos colaterales en mamíferos, tener baja persistencia y un espectro de acción muy específico. Sin embargo, existen varios inconvenientes reales que se deben mencionar: las δ -endotoxinas se inactivan con la luz ultravioleta y se lavan con la lluvia. Además, debido a los hábitos alimenticios de *T. orizicolus*, el principio activo del bioinsecticida debería llegar al floema para que así sea ingerido por el insecto al alimentarse de los elementos cribosos.

Los inconvenientes antes mencionados favorecen la estrategia de introducir mediante ingeniería genética los genes que codifican por las proteínas insecticidas para producir plantas de arroz que expresen dichas toxinas. La manipulación de sus genes ha permitido producir plantas transgénicas que toleren el ataque por insectos como es el caso de tomate (Perlak, *et al.*, 1990), algodón (Kozziel *et al.*, 1993), maíz (Fujimoto *et al.*, 1993) y el arroz, entre otros.

La expresión de toxinas de *Bt* en el floema de las plantas transgénicas de arroz requiere del promotores específicos para este tejido, del cual se alimenta *T. orizicolus*. Esta estrategia no depende de aplicaciones constantes del producto bioinsecticida y conlleva únicamente a la compra y siembra de semilla modificada genéticamente. Es interesante mencionar que Bernal y colaboradores (2002) detectaron la presencia de toxinas de *Bt* en la mielecilla excretada por *Nilaparvata lugens* cuando se alimentó de líneas transgénicas de arroz. Este resultado, indica que tanto enemigos naturales de *N. lugens* y otros insectos que se alimenten de estas secreciones podrían afectarse con dichas toxinas. Lo anterior sugiere que previo a la liberación de plantas transgénicas se deben realizar estudios de su efecto sobre enemigos naturales y otros insectos del ecosistema del arroz.

Se ha informado además que algunos homópteros como *N. lugens* y *N. virescens* cambiaron sus hábitos alimenticios al alimentarse de las líneas transgénicas al por lo que se sugiere que pudieron detectar la presencia de la toxina de *Bt* (Glare y Callaghan, 2000). Asimismo, en varios estudios se observó un incremento en la secreción de mielecilla ácida, esto se cree que se debe a que el insecto se está alimentando del xilema, para los cuáles se ha reportado un pH más ácido, o de otros tejidos diferentes al floema, (Glare y Callaghan, 2000). Esto es de importancia ya que el hábito alimenticio de los insectos determinará la cantidad de inóculo ingerido, y por ende su susceptibilidad a las proteínas Cry.

Es importante resaltar que los sembradíos de arroz albergan una comunidad amplia y entrelazada de artrópodos herbívoros, depredadores, parasitoides, detritívoros, por lo que el control biológico es de suma importancia para el manejo de las plagas del arroz. Esta importancia se demostró por el resurgimiento de poblaciones resistentes de *Nilaparvata lugens* (Stal), como resultado del uso indiscriminado de insecticidas sintéticos

de amplio espectro en los 1970s (Benrey y Lamp, 1994). Por ende, debido a la importancia del control biológico en el manejo de plagas de arroz, es importante que las nuevas tecnologías se evalúen tomando en consideración efectos secundarios sobre insectos benéficos del ecosistema arrocero.

Para la realización de bioensayos con *Bt* uno de los factores limitantes es la obtención de numerosos insectos vigorosos para poder evaluar las cepas de interés. Para esto se establecieron colonias sanas y estables de *T. orizicolus*. Estudios sobre enemigos naturales de *T. orizicolus* han reportado a los órdenes Hymenoptera, Hemiptera y Díptera (Rey y García, 1980) como los principales controladores biológicos de esta plaga tanto en insectario como en campo. Resultados similares se observaron en las colonias establecidas durante esta investigación en el insectario del CIBCM en donde *H. hernandezae* (Hymenoptera) y *C. lividipennis* (Hemiptera) fueron los principales enemigos naturales de las colonias de *T. orizicolus*. Asimismo, diversas especies de arañas depredaron las poblaciones de *T. orizicolus* durante el establecimiento de las colonias, sin embargo, éstas son menos específicas (Mora y Mora, 1999). Es importante mencionar que el uso de técnicas de control para evitar el incremento de estos enemigos naturales, el establecimiento de condiciones de temperatura y humedad controladas así como fuente de alimento nutritiva, son factores determinantes para disponer de una colonia sana y estable de *T. orizicolus*, óptima para realizar bioensayos.

Fue también de gran relevancia documentar el estadio ninfal de *T. orizicolus* apto para realizar bioensayos. Se encontró así que los instares primero y segundo no son aptos ya que son muy susceptibles al daño mecánico durante la manipulación, obteniéndose índices muy elevados de mortalidad en los testigos. Los insectos de tercero y cuarto estadio ninfal resultaron ser resistentes a la manipulación, obteniéndose una mortalidad natural menor al 10%.

Se estableció un método de aislamiento de cepas de *Bt* a partir de insectos vivos y muertos con una eficiencia del 40%. Es importante mencionar que Arrieta y colaboradores (2000), obtuvieron un 65% de aislamiento de *Bt* a partir de muestras suelo, hojarasca y otros sustratos de zonas protegidas. Sin embargo, es de esperar que en ecosistemas

naturales haya mucho mayor diversidad de insectos que en los agroecosistemas muestreados en este trabajo, lo cual podría relacionarse con un porcentaje menor de recuperación de cepas de *Bt* obtenido. Sin embargo se han reportado eficiencias del 10% para el coleóptero *Hypothenemus hampei* (comunicación personal G. Arrieta) y de 4-30% a partir de intestinos de lepidópteros (comunicación personal L. Uribe). De los datos anteriores se desprende que la eficiencia de recuperación varía dependiendo de la especie de insecto, de su hábito alimenticio y de los hábitats que frecuenta.

En esta investigación se utilizaron homópteros vivos y muertos como muestras ambientales a partir de los cuales se aisló de *Bt*, ya que *T. orizicolus* pertenece al orden Homoptera. En la estrategia anterior se dirige la obtención de cepas de *Bt* a partir de insectos que puedan estar infectados con *Bt* en el momento de la captura. A. Bravo y colaboradores (comunicación personal) lograron aislar cepas de *Bt* muy efectivas contra los órdenes Hymenoptera, Homoptera y Coleoptera, utilizando la estrategia anterior. Es interesante indicar que dos de las cepas de la colección que presentaron efectos tóxicos contra *T. orizicolus* fueron aisladas a partir de esta misma especie.

Aún cuando la mayoría de cepas se aislaron de insectos de ecosistemas agrícolas el análisis electroforético mediante SDS-PAGE de las δ -endotoxinas mostró patrones electroforético muy diversos, con proteínas de diferentes pesos moleculares entre las cepas de la colección. A diferencia de otras colecciones en donde se ha informado de una alta frecuencia del gen *cryI* (Bravo *et al.* 1998), la colección caracterizada en esta investigación mostró que solo 4 cepas contenían dicho gen, siendo el *cyt* el más frecuente (8 cepas). Vale la pena resaltar que la mayoría de las cepas (25) no amplificaron con ninguno de los iniciadores utilizados, cepas que posiblemente contienen genes novedosos que codifiquen por proteínas Cry con nuevas especificidades. Esta diversidad conlleva a analizar en un futuro la toxicidad de estas cepas contra otros insectos plaga.

Los bioensayos burdos resultaron efectivos para el tamizaje inicial de la toxicidad de las cepas de la colección. En estos bioensayos se utilizaron concentraciones altas de inóculo (1 mg/ml), siendo este ensayo válido para iniciar la selección de cepas de una colección amplia. Esto permite decidir cuáles cepas presentan actividad y cuáles no. La

toxicidad observada para *T. orizicolus* de las cepas 26-O-to, 40-X-m, 23-O-to, GP43, Bti y HD1 fue del 70% y 100% en bioensayos burdos, por lo cual se requiere verificación mediante bioensayos finos. Es importante resaltar que la mezclas de esporas y cristales de las cepas de *Bt* evaluadas se lavaron y centrifugaron con el fin de descartar la posible presencia de beta-exotoxina y consecuentemente obtener datos reales de la toxicidad de las δ -endotoxinas.

Debido a que *Bemisia tabaci* y *Tagosodes orizicolus* pertenecen al orden Homoptera, se decidió utilizar la cepa GP3, donada por A. Bravo de la UNAM, México para los ensayos de unión al epitelio intestinal de *T. orizicolus*, detectándose una leve unión de la GP3. Es necesario mencionar que estos experimentos se realizaron antes de probar la toxicidad de la GP3 mediante bioensayos. Sin embargo, no se detectó toxicidad contra este delfácido en los bioensayos burdos posteriores con esporas y cristales de esta cepa. Este resultado parece apoyar otros estudios que demuestran que la toxicidad de las proteínas Cry de *Bt* hacia una especie dada no implica que se obtengan resultados similares con especies relacionadas (Glare and Callaghan, 2000). Se concluye entonces que la susceptibilidad de insectos hacia cepas de *Bt* debe estudiarse caso por caso (Glare and Callaghan, 2000). Sin embargo, resultaría interesante si el cristal solubilizado y tripsinizado de la GP3 es activo contra *T. orizicolus*.

Se ha observado que en algunas ocasiones las características de la unión de la toxina se correlaciona con su toxicidad. Otras investigaciones demuestran que toxinas poco potentes se unen con una afinidad similar o mayor que toxinas más potentes (Aranda, 1996). Esto se debe principalmente, a que la unión sí es necesaria pero no suficiente para la toxicidad, por lo que no resulta un indicadores de la potencia de la toxina. En el caso de la cepa GP3 sí demostró una interacción de la toxina con las microvellosidades del epitelio intestinal de *T. orizicolus*, sin embargo podría no darse la unión irreversible, por lo que no hay efecto tóxico notable. Sería importante analizar la unión de las proteínas Cry de las cepas 26-O-to, 40-X-m, HD1, GP43, Bti y 23-O-to con el fin de determinar si la toxicidad que presentaron contra *T. orizicolus* correlaciona con un patrón de unión *in vitro*.

REFERENCIAS

- Aranda E. 1996. Interaction of *Bacillus thuringiensis* crystal protein with the midgut epithelial cells of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Invertebrate Pathol.* 68:203-212.
- Arrieta. G., Rodríguez. C., Viquez. A., Mora. R., Espinoza. A.M. 2000. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de áreas protegidas de Costa Rica. Informe para la Fundación CRUSA. Pp 58.
- Benrey, B. y W.O. Lamp. 1994. Biological control in the management of planthopper populations. Pp.519-549. In R.F. Denno y C.J. Perfect. (ed). *Planthoppers, their ecology and management*. Chapman and Hall, Col. New York.
- Bernal C.C., M. Remedios y M Cohen. 2002. Effect of rice lines transformed with *Bacillus thuringiensis* toxin genes on the brown planthopper and its predator *Cytorhinus lividipennis*. *Entomologia Experimentalis et Applicata*. 102:21-28.
- Bravo. A. *et al.* 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and environmental Microbiology* 64:4965-4972.
- Fujimoto H., K. Itoh, M. Yamamoto, J. Kyosuka y K. Shimamoto. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified delta-endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology*. 11:1151-1155.
- Glare T. y M. Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis: Biology, Ecology and Safety*. John Wiley and Sons, LTD. UK. Pp 308.
- Rey X. y A. García. 1980. Estudios de algunos aspectos del ciclo biológico de *Sogatodes orizicolus*. *Cienc. Tec. Agric. Arroz*, Vol. 3, No. 1.

Mora-Castro , R. y F. Mora-Kepfer. 1999. Estudio preliminar para el manejo integrado de *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae) (Muir), vector del virus de la hoja blanca del arroz. Sin publicar