

EVALUACIÓN DE CEPAS NATIVAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* BERLINER PARA EL CONTROL DE *HELIOTHIS VIRESCENS* FABRICIUS EN EL CULTIVO DEL TABACO EN CUBA

Bertha Carreras Solís, Dayamí Rodríguez Batista y Felicia Piedra Díaz

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5.^a B y 5.^a F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, bcarreras@inisav.cu

RESUMEN

Cultivos líquidos de ocho cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner se evaluaron en larvas de segundo instar de *Heliothis virescens* Fabricius. La cepa LBT-111 mostró el 50% de mortalidad al segundo día del experimento. Un segundo bioensayo con esta cepa permitió determinar la CL_{50} contra *H. virescens* que fue de $2,6 \times 10^7$ esporas $\cdot mL^{-1}$ y la correlación más alta (0,95) se obtuvo con los resultados de 48 h de bioensayo. Los límites de confianza ($p \leq 0,05$) en la línea de correlación concentración-probit mostraron márgenes estrechos a las 48 h, lo que denota la confiabilidad en la determinación de la CL_{50} .

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Heliothis virescens*, control biológico, CL_{50}

ABSTRACT

Liquid culture of eight *Bacillus thuringiensis* strains were evaluated on second instar larvae of *Heliothis virescens* Fabricius. LBT-111 strain showed 50% of mortality the second day of experiment. A second bioassay with this strain allowed to determinate the CL_{50} against *Heliothis virescens*, which was 2.6×10^7 spores/ mL^{-1} and the highest correlation (0.95) was obtained with the data of 48 h. The confidence limits ($p \leq 0.05$) in the dose-probit correlation line showed narrow margins with the data of 48 h, which indicate the accuracy in the calculation of the CL_{50} .

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Heliothis virescens*, biological control, CL_{50}

INTRODUCCIÓN

En Cuba el cultivo del tabaco es atacado por defoliadores que causan pérdidas considerables, y es *Heliothis virescens* Fabricius (cogollero del tabaco) el más importante [Blanco *et al.*, 2007]. El comportamiento poblacional de esta plaga en el país lo ubica en todas las provincias y bajo todas las condiciones de cultivo [Piedra, 1985].

Jiménez (1995) definió las cepas LBT-21 y LBT-24 de *B. thuringiensis* como las de mayor toxicidad sobre larvas de *H. virescens*, y determinó que la cepa LBT-21 producía niveles de efectividad del 72,3% en campos de tabaco después del tercer día de aplicación. Esta misma cepa utilizada durante varias campañas en la provincia de Sancti Spiritus declinó su efectividad a menos del 50% [Monzón y Ayala, 1999, comunicación personal]. Por esta razón siempre resulta muy importante el poder contar con otras alternativas para manejar problemas de insecto-resistencia.

El daño principal de *H. virescens* al tabaco es en la hoja, que es el producto comercial del cultivo, por lo que resulta importante contar con cepas de *B. thuringiensis* que no solo muestren patogenicidad, sino que sean virulentas y agresivas, de forma tal que en el menor tiempo posible la plaga deje de afectar el cultivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo la evaluación de cepas nativas de *B. thuringiensis* contra larvas de segundo estadio de *H. virescens* en el cultivo del tabaco para seleccionar la cepa más promisoría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como material biológico se utilizaron las cepas de *Bacillus thuringiensis* LBT-101, LBT-102, LBT-103, LBT-104, LBT-105, LBT-107, LBT-108 y LBT-111 aisladas de suelo de cultivo de tabaco de las provincias de Sancti Spiritus y Pinar del Río [Carreras, 2009].

Para el bioensayo de la actividad biológica frente a *H. virescens* se partió de colectas de larvas en campos cultivados de tabaco, libres de productos químicos y biológicos. Las larvas se llevaron al laboratorio de Biología del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (Inisav), donde se estableció la cría del insecto según metodología descrita por Piedra (1980), consistente en colocar las larvas en cápsulas con pedazos de hojas de tabaco y papel de filtro en el fondo para mantener la humedad del alimento. Cuando las larvas eclosionaron se pasaron a cápsulas de Petri individualmente con hojas de tabaco fresco como alimento, y se realizaron observaciones del desarrollo, comportamiento y características del insecto. Se utilizaron larvas de *H. virescens* del segundo estadio de crecimiento.

Las suspensiones de esporas y cristales de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas se obtuvieron a partir del crecimiento obtenido en tubos con agar nutriente en plano inclinado. Para los bioensayos se utilizaron cuatro concentraciones (10^9 , 10^8 , 10^7 , 10^6 esporas \cdot mL⁻¹) preparadas con solución salina estéril de NaCl 0,85%.

Se colocaron 10 larvas individualmente en placas de Petri de 9 cm de diámetro, con hojas de tabaco asperjadas con cada una de las diferentes concentraciones. Se utilizó un control negativo donde las hojas de tabaco se asperjaron con agua destilada estéril, y cada variante estuvo conformada por tres réplicas. La mortalidad se evaluó cada 24 h durante siete días consecutivos. El porcentaje de mortalidad se determinó mediante la fórmula de Abbott corregida:

$$\% \text{ mortalidad} = 1 - \left[\frac{\text{ind.vivos} - \text{ind.muertos}}{\text{ind.vivos}} \right] 100$$

Fórmula de Abbott corregida

$$\% \text{ mortalidad corregida} = \frac{\% \text{ mortalidad muestra} - \% \text{ mortalidad testigo}}{100 - \% \text{ mortalidad testigo}} 100$$

Los insectos muertos se desinfectaron con una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 0,05% y se secaron a 37°C. Posteriormente el material se suspendió en solución salina (0,85%) y se sometió a pretratamiento térmico en baño de María a 80°C por 10 min. Una asada de la suspensión se sembró por agotamiento en placas con agar nutriente para observar la presencia de colonias con morfología típica de *B. thuringiensis*.

Con el objetivo de corroborar la muerte del insecto por la acción de *B. thuringiensis*, las células seleccionadas se tiñeron con solución de violeta cristal 0,5% y se observaron al microscopio óptico con objetivo de inmersión para detectar la presencia del complejo spora-cristal.

Los porcentajes obtenidos de mortalidad para cada cepa se analizaron mediante el Modelo Lineal General de medidas repetidas y se utilizó el programa computacional SPSS para Windows versión 11.5.2.1.

La cepa seleccionada como promisoría, basado en este criterio, se sometió a otro bioensayo para obtener las líneas de regresión probit de mortalidad-concentración y calcular la concentración letal media (CL₅₀) [Finney, 1971] con la utilización de un programa computarizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se evidenciaron resultados diferentes en cuanto al control de *H. virescens*, aun cuando las cepas ensayadas coexistían en el mismo hábitat del insecto.

Las cepas seleccionadas mostraron patogenicidad en mayor o menor grado hacia las larvas de *H. virescens* y presentaron diferencias estadísticas significativas cuando se realizó la prueba de comparación múltiple DHS de Tukey, lo que permitió seleccionar a la cepa LBT-111 como la más promisoría para el control de larvas de segundo estadio de *H. virescens* (Tabla 1).

Los resultados muestran correspondencia con los obtenidos por Gómez *et al.* (2006) y Weathersbee *et al.* (2006), quienes encontraron diferencias significativas en los porcentajes de mortalidad hacia el picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman y *Diaprepes abbreviatus*, respectivamente, entre cepas de *B. thuringiensis* portadoras de proteínas Cry informadas como tóxicas hacia coleópteros.

Para el segundo ensayo se escogió la cepa de *B. thuringiensis* LBT-111 por mostrar mayor toxicidad so-

bre larvas de *H. virescens*, y se determinó la CL_{50} . La actividad tóxica de *B. thuringiensis* sobre larvas de lepidópteros se expresa en términos de la dosis letal

media (DL_{50}), o la concentración letal media (CL_{50}) para larvas de primer y segundo estadio cultivadas en el laboratorio [Gallegos *et al.*, 2003].

Tabla 1. Prueba de comparación múltiple DHS de Tukey para las cepas de *B. thuringiensis* ensayadas frente a larvas de *Heliothis virescens*

[I] Cepa	[J] Cepa	Diferencia entre medias [I-J]
LBT-111	LBT-101	47,36
	LBT-102	12,54
	LBT-103	18,75
	LBT-104	35,71
	LBT-105	43,18
	LBT-107	15,18
	LBT-108	8,93

La diferencia de medias es significativa al nivel 0,05.

La CL_{50} de las larvas fue de $2,6 \times 10^7$ esporas \cdot mL⁻¹. Las correlaciones calculadas para las variables probit de mortalidad y logaritmo de la concentración variaron de 0,95 a 0,70 cuando la mortalidad se cuantificó de 48 hasta 120 h (Tabla 2). La correlación más alta (0,95) se obtuvo con los datos de 48 h de bioensayo. Los resultados coinciden con los obtenidos por Gallegos *et al.* (2003), quienes informaron correlaciones similares con los datos de 48 y 72 h de ensayo.

Es lógico obtener correlaciones más altas en menor tiempo con larvas de mayor tamaño, debido a que a mayor desarrollo (edad del insecto) se requiere mayor concentración del cultivo para obtener la concentración letal, o bien, a mayor tiempo de exposición se requiere menor concentración para lograr el mismo porcentaje de muerte. Esta información es importante para el manejo estratégico de las dosis de campo de *B. thuringiensis*.

Tabla 2. Concentración correspondiente al 50% de mortalidad

Tiempo (h)	Mortalidad (%)	Dosis correspondiente	Límite inferior	Límite superior	Coefficiente correlación (R)
48	50	$2,6 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$	$2,7 \times 10^7$	0,95
72	50	$6,5 \times 10^6$	$1,9 \times 10^6$	$1,1 \times 10^7$	0,77
96	50	1×10^4	$4,2 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	0,70
120	50	1×10^3	$0,4 \times 10^3$	$1,5 \times 10^4$	0,70

Nivel de confianza 95%.

Los límites de confianza ($p = 0,05$) en la línea de correlación concentración-probit (Tabla 2) muestran márgenes estrechos a las 48 h, lo que denota la confiabilidad en las determinaciones; sin embargo, a partir de las 72 h se aprecian márgenes amplios y correlaciones bajas, con mayor probabilidad de error en la cuantificación del grado de toxicidad de *B. thuringiensis*.

La cepa LBT-111 puede considerarse, por tanto, una cepa promisoría en el control de este insecto, al lograr mortalidades al menor tiempo y a la menor concentración utilizada, por lo que se hacen necesarios ensayos a nivel de campo para comprobar la efectividad de la cepa en condiciones no tan controladas.

CONCLUSIONES

- La cepa LBT-111 presentó toxicidad sobre larvas de segundo estadio de *Heliothis virescens* en condiciones de laboratorio, con una (CL_{50}) de $2,6 \times 10^7$ esporas \cdot mL⁻¹, por lo que representa una alternativa potencial para el manejo de este insecto en el cultivo del tabaco.

REFERENCIAS

- Blanco, C. A.; A. P. Terán-Vargas; J. D. López, Jr.; J. V. Kauffman; X. Wei: «Densities of *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae) in Three Plant Hosts», *Fla. Entomol.* 90: 742-750, EE. UU., 2007.

Carreras y otros

- Carreras, B.: «Obtención de aislados de *Bacillus thuringiensis*, Berliner, autóctonos de Cuba», *Fitosanidad* 13(2):109-115, La Habana, 2009.
- Finney, D. J.: *Probit Analysis*, 3th ed., Cambridge University Press, Londres, 1971, pp. 20-63 .
- Gallegos, G.; M. Cepeda; E. Aranda; L. O. Tejeda; D. Enkerlin: «Evaluación del efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) sobre larvas del segundo estadio de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae)», *Agrociencia* 37:405-411, México, 2003.
- Gómez, S.; G. Díaz; V. M. Núñez: «Evaluación de la toxicidad de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre el picudo del algodón-ro *Anthonomus grandis* Boheman», *Agronomía Colombiana* 24 (2):296-301, Colombia, 2006.
- Jiménez, R. J.: «Lucha biológica contra el cogollero del tabaco *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera: Noctuidae) con biopreparados nacionales y comerciales a base de *Bacillus thuringiensis* Berliner en Cuba», tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Las Villas, Inisav, La Habana, 1995.
- Piedra, F.: «Estudio bioecológico y control químico de *Heliothis virescens* (Fabricius) en el cultivo del tabaco», Informe final de resultado 01. 004. 05, PCT 1975-1975, Minag, La Habana, 1980.
- : *Metodología para la señalización de Heliothis virescens (F.) en el cultivo del tabaco*, Manual Metodológico, CNSV, Minag, La Habana, 1985.
- Weathersbee, A. A.; F. L. Lapointe; R. G. Shatters: «Activity of *Bacillus thuringiensis* Isolates Against *Diaprepes abbreviatus* (Coleoptera: Curculionidae)», *Fla. Entomol.* 89(4):441-448, EE. UU., 2006.