

# Diseño y evaluación de un método para determinar la actividad de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

Design and evaluation of a methodology to characterize the biopesticide activity of *Bacillus thuringiensis* native strains against *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae)

MARÍA RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, LUIS E. TORRES<sup>1</sup>, DANIEL URIBE<sup>2</sup>, JAIRO CERÓN<sup>3</sup>, ALFREDO ACOSTA<sup>4</sup>

Revista Colombiana de Entomología 27(3-4): 187 - 192 (2001)

**Resumen.** *Bacillus thuringiensis* (Bt), como agente de control biológico, posee ventajas que lo hacen atractivo en el Manejo Integrado de Plagas. La investigación acerca del mismo está en pleno auge y día a día van apareciendo nuevas cepas y productos comerciales, con alto potencial de actividad biopesticida hacia organismos plaga de interés en la agricultura local de diversos países en todo el mundo. *Spodoptera frugiperda* es una de esas plagas que debido a su efecto devastador sobre algunos cultivos como maíz, algodón, sorgo y arroz, entre otros, y al surgimiento de resistencia a partir de la aplicación de pesticidas convencionales, es susceptible de ser controlada a partir de cepas nativas de *B. thuringiensis*. En el presente estudio, se pretendió estandarizar un método de bioensayo para evaluar la actividad bioplaguicida de cepas nativas de Bt contra *S. frugiperda*. Se trabajó en condiciones de laboratorio sobre dieta artificial con larvas de primer instar del insecto blanco, empleando la cepa Bt subesp. *aizawai* HD-137, portadora de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1C* y *cry1D*, como cepa de referencia de la actividad bioplaguicida. Se evaluaron veinte cepas nativas de suelos colombianos siguiendo el diseño del método propuesto. Los resultados de este estudio permitieron concluir que el modelo de bioensayo usado cumplió con las especificaciones de ser sensible, eficiente, reproducible y rápido, por lo cual se adoptó y se recomienda su uso para pruebas similares. Adicionalmente, se encontró una actividad bioplaguicida importante en cuatro de las veinte cepas evaluadas, lo cual sugiere una gran diversidad de cepas en cuanto al número de genes que codifican por las diferentes  $\delta$ -endotoxinas y un gran potencial de uso de las mismas en nuestro país.

**Palabras clave:** Control biológico. *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera frugiperda*. Bioensayos. Biodiversidad microbiana.

**Summary.** *Bacillus thuringiensis* (Bt), like a biological control agent has some advantages, which make it attractive for an Integrated Pest Management program. The research about Bt is increasing each day; for instance new strains and commercial products with high biopesticide activity against local agricultural pest insects of different countries are rising. *Spodoptera frugiperda* (J.E Smith) is a very aggressive pest insect, which affects important agricultural crops in our country like corn, cotton, shorghun and rice. That insect is good target to be controlled by native strains of Bt as long as it developed resistance to the conventional chemical insecticides. In this study, it was presented a methodology to evaluate the biopesticide activity of Colombian native strains of Bt against *S. frugiperda*. It was worked in lab conditions with first instar larvae on artificial diet. The Bt *aizawai* HD137, which has the *cry* genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*, *cry1C* and *cry1D* was used as biopesticide activity reference strain. Twenty native strains from Colombian soils were evaluated by the designed methodology. It was concluded that the bioassay methodology is sensitive, repetitive, efficient and fast methodology, which can be used in similar tests. In addition, an important biopesticide activity, in four out of 20 strains evaluated, was found, which suggests a great diversity of strains and genes for  $\delta$ -endotoxin and a huge potential of these strains to be used in our country.

**Key words:** Biological control. *Bacillus thuringiensis*. *Spodoptera frugiperda*. Bioassay. Microbial biodiversity.

## Introducción

*Bacillus thuringiensis* (Berliner) es el agente entomopatógeno más ampliamente usado dentro de los programas de Manejo Integrado de Plagas, con más de 90% del mercado actual de bioplaguicidas a nivel mundial y un número creciente de pro-

ductos comerciales disponibles (Feitelson *et al.* 1992; Shah y Goettel 1999). Su importancia dentro del mercado de bioplaguicidas ha llevado a que diferentes centros de investigación de países desarrollados y en vía de desarrollo presenten

interés en el establecimiento de colecciones de cepas nativas de este microorganismo, con el objeto de identificar cepas que sean aplicables para el control de organismos plaga de importancia en cada país (Martin y Travers 1989; Chilcott y Wigley

1 I. A. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

2 Biólogo, MSc. Protección de Cultivos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia., A. A. 14490, Bogotá. E-mail: duribe@ibun.unal.edu.co

3 Químico Farmacéutico, MSc., PhD. Instituto de Biotecnología Universidad Nacional de Colombia, A. A. 14490, Bogotá.

4 MSc. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

1993; Hossain *et al.* 1997; Theodoluz *et al.* 1997).

El proceso de identificación de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* (Bt) con un uso potencial en el manejo integrado de plagas, supone el diseño y evaluación de la actividad bioplaguicida de dichos aislamientos, empleando técnicas adecuadas de bioensayo. La evaluación de la actividad bioplaguicida de agentes microbianos de control biológico de plagas puede ser llevada a cabo por una gran variedad de métodos. La escogencia del método va a estar determinada por el tipo de pregunta que se desee responder y la exactitud y precisión que se necesite en la respuesta. En la caracterización de las diferentes colecciones mundiales de Bt se encuentran métodos cuyo interés se centra simplemente en clasificar un gran número de aislamientos (más de 5.000), con o sin actividad bioplaguicida contra un hospedero determinado, sin llegar a cuantificar o comparar con una cepa patrón (Martin y Travers 1989; Chilcot y Wigley 1993; Bernhard *et al.* 1997). Por otra parte, se presentan bioensayos donde se realiza una caracterización detallada a nivel bioquímico y molecular de los aislamientos, con el objeto de tener elementos de juicio para, posteriormente, llevar a cabo ensayos con el principio activo previamente cuantificado y así conocer el potencial de las cepas seleccionadas con relación a una cepa de referencia (Bravo *et al.* 1998; Chak *et al.* 1994; Kaelin *et al.* 1994).

*Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) es un insecto considerado como plaga en varios países de la zona tropical, con una amplia distribución geográfica en ecosistemas distribuidos entre los 0 y los 2600 m sobre el nivel del mar. En Colombia este insecto se presenta con frecuencia atacando cultivos de algodón, maíz, arroz, sorgo y soya y ocasionalmente en pastos, lechuga y coliflor, entre otros (Vélez 1997; Saldarriaga *et al.* 1987). Dada la importancia de esta plaga en nuestro país, el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional, se ha propuesto realizar una colección de aislamientos nativos de Bt y evaluar su potencial bioplaguicida para el control de *S. frugiperda*. Como el Instituto de Biotecnología, otras instituciones han manifestado un interés en su control a partir de cepas nativas de Bt (Bosa y Cotes 1997; Arango *et al.* 1999). Sin embargo, los métodos desarrollados por estos grupos presentan algunas características que sería deseable mejorar, como su eficiencia ya que en el caso de Arango *et al.* (1999), fue necesario realizar bioensayos a 1100 aislamientos nativos para identificar únicamente 34 cepas con actividad bioplaguicida contra esta plaga. Así mismo, el método sugerido por Bosa y Cotes (1997) emplea niveles altos de principio activo espora cristal (alrededor de 30 µg) para evaluar la actividad bioplaguicida sobre una larva de *S. frugiperda*. Por último, llama la atención que ambos grupos empleen la cepa de referencia HD1 subesp. *kurstaky*

como patrón de comparación de actividad en sus estudios, a pesar de que dicha cepa no presenta los genes *cry1C*, *cry1D* y *cry1E* que usualmente han sido asociados a la actividad bioplaguicida contra *S. frugiperda* (Visser *et al.* 1990; Van Rie *et al.* 1990; Bohorova *et al.* 1997; Bravo *et al.* 1998). Dentro de este contexto, el presente estudio tiene como objetivo diseñar un método alternativo para la evaluación de cepas nativas de Bt contra larvas de primer instar de *S. frugiperda*, el cual sea sensible, reproducible y rápido. Así mismo se muestran algunas cepas de Bt de la colección del Instituto de Biotecnología consideradas como promisorias por su actividad bioplaguicida contra el insecto blanco de interés en este estudio.

### Materiales y Métodos

**Colección microbiológica.** En el presente estudio se utilizaron cepas de *Bacillus thuringiensis* (B.t) pertenecientes al cepario del laboratorio de biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. Dichas cepas fueron aisladas de suelos colombianos siguiendo el método previamente descrito por Travers *et al.* (1987). Por otra parte, se empleó la cepa de referencia Bt HD-137 subesp. *aizawai*, la cual fue donada por el laboratorio de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Todas las cepas fueron mantenidas y cultivadas para la elaboración de los bioensayos en medio de cultivo agar nutritivo a 30°C hasta su esporulación.

**Material entomológico.** El material entomológico empleado en este estudio consiste en el establecimiento de un pie de cría de insectos de *Spodoptera frugiperda*, colectados en cultivos de algodón de los departamentos de Córdoba y Tolima y mantenidos en condiciones de laboratorio a una temperatura de 25°C±2, humedad relativa de 65%±5% y fotoperíodo de 16:8 horas (luz - oscuridad). La alimentación de las larvas se realizó empleando la dieta artificial propuesta por López (1986).

**Caracterización de las cepas nativas de *B. thuringiensis*.** Las cepas nativas de Bt seleccionadas para este estudio, fueron caracterizadas mediante la observación de micropreparados con tinción de cristal violeta con el objeto de determinar la morfología del cristal paraesporal. Posteriormente, se determinó el número y tamaño de las proteínas asociadas al cristal mediante la elaboración de geles de poliacrilamida al 15% (PAGE) de acuerdo con la metodología de Perbal (1988). Finalmente, dichas cepas fueron sometidas a una caracterización molecular tendiente a la identificación de los genes *cry* de Bt. Dicha caracterización se llevó a cabo mediante la técnica de PCR diseñada por Cerón *et al.* (1994) y Cerón *et al.* (1995), empleando primers generales para genes *cry1* y específicos para identificar genes *cry1Aa* a *cry1Fa*.

**Evaluación de la actividad bioplaguicida de cepas nativas de Bt.** Las condiciones propuestas a continuación para la evaluación de la actividad bioplaguicida de cepas nativas de *B. thuringiensis* contra larvas de *S. frugiperda*, son el resultado de un proceso de revisión de literatura y normalización preliminar, el cual luego de diferentes ensayos en el laboratorio permite proponer un método de bioensayo, conformado por las siguientes etapas: 1) Diseño y evaluación de un método de bioensayo; 2) Determinación de la Concentración Letal cincuenta (CL50), para la cepa de referencia HD137 la cual posee actividad bioplaguicida conocida contra *S. frugiperda*; 3) Selección de 20 cepas nativas de *B. thuringiensis* del cepario del Instituto de Biotecnología, de acuerdo con el contenido de genes *cry* arrojado por el análisis por PCR, teniendo en cuenta el criterio de actividad contra *S. frugiperda*; 4) Determinación de la actividad bioplaguicida de las cepas nativas de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda*, empleando como concentración única la CL50 de la cepa de referencia HD137 y 5) Determinación de la CL50 de las cepas que presentaron una mayor actividad bioplaguicida que la cepa de referencia en el ensayo anterior.

**Método de bioensayo.** Para la determinación de la actividad bioplaguicida de las diferentes cepas de Bt se emplearon larvas de primer instar de *S. frugiperda*. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de cultivo celular de poliestireno de 24 pozos marca Corning. Cada pozo, el cual posee un área de 2cm<sup>2</sup>, fue previamente llenado con dieta merídica (López 1986) empleada para el crecimiento de las larvas de *S. frugiperda*. Posteriormente, se dispuso en cada pozo la concentración de toxina a emplear, en un rango entre 0 y 1500 ng/cm<sup>2</sup> (empleando 6 dosis que se incrementaron cada 250ng/cm<sup>2</sup>), para el caso de la determinación de la CL50 y de 1000 ng/cm<sup>2</sup> para el tamizaje de las cepas nativas de Bt. La toxina fue previamente diluida en 40 µl de agua destilada desionizada estéril y dispuesta sobre la superficie de la dieta. Finalmente, se adicionó una larva de primer instar por pozo para un total de 72 larvas neonatas por tratamiento. Las placas de bioensayo se incubaron a 25°C±2, con una humedad relativa de 65%±5 y un fotoperíodo de 16:8 (luz:oscuridad). La mortalidad se evaluó a los 7 días de incubación.

**Análisis de resultados.** Para la determinación de los valores de la CL50 se empleó el análisis estadístico de regresión logarítmico Probit del programa POLO-PC (Robertson *et al.* 1980).

### Resultados

**CL50 de la cepa de referencia Bt HD137.** El método de bioensayo se evaluó empleando la cepa de referencia de *B. thuringiensis* subesp. *aizawai* HD137, la cual presenta algunos de los genes con actividad bioplaguicida contra *S. frugi-*

perda (Cerón *et al.* 1994; Bohorova *et al.* 1997). En la figura 1 se muestra la gráfica de la determinación de la CL50 para dicha cepa, la cual arrojó un valor de concentración letal media de 1012 ng/cm<sup>2</sup> ( $\pm 137$ ). Siguiendo con el esquema del método mencionado, se prosiguió con la evaluación de la actividad bioplagueada de las cepas nativas de Bt a una concentración de 1000 ng/cm<sup>2</sup>.

**Selección de las cepas nativas.** En la Tabla 1 se presenta una descripción general de las características de las cepas nativas seleccionadas para el desarrollo del presente estudio. Como se mencionó, uno de los criterios que se tuvo en cuenta para la selección de las cepas nativas, fue la presencia dentro de su material genético, de los genes *cry1C*, *cry1D* y *cry1E* por su actividad bioplagueada conocida contra larvas del género *Spodoptera* y específicamente contra *S. frugiperda* (Visser *et al.* 1990; Van Rie *et al.* 1990; Bohorova *et al.* 1997). Así mismo, se seleccionaron otras cepas nativas con genes diferentes como el *cry1Ab*, el cual, de acuerdo con Bohorova *et al.* (1997), presenta actividad bioplagueada importante contra *S. frugiperda*. Con esto se pretendía determinar la importancia de esta actividad en el contexto de las cepas nativas de nuestra colección.

Por otra parte vale la pena resaltar la alta variabilidad de los perfiles de genes *cry* arrojados por el análisis de PCR, lo cual da una idea del potencial en términos de la diversidad de la especie en el país ya que se observan 9 perfiles diferentes en los 18 aislamientos estudiados. Por último, cabe mencionar que las cepas nativas han sido obtenidas de diferentes tipos de cultivo

haciendo cierto énfasis en cultivos como arroz y maíz, donde se espera la presencia de *S. frugiperda* en Colombia.

**Actividad bioplagueada de las cepas nativas de Bt.** Una vez determinada la CL50 de la cepa de referencia y seleccionadas las cepas nativas de Bt, se procedió a evaluar la actividad bioplagueada de éstas sobre larvas de primer ínstar de *S. frugiperda*. En la figura 2 se observa el porcentaje de mortalidad obtenido para cada cepa a una concentración de 100 ng/cm<sup>2</sup>.

Las cepas nativas IBUN5.1, IBUN10.2, IBUN23.4 e IBUN32.8 mostraron un porcentaje de mortalidad de 59.7, 71.7, 67.2 y 69%, respectivamente, los cuales fueron superiores a la cepa de referencia HD137 cuyos valores oscilaron entre 42.57 y 54.16% para todas las repeticiones reali-

zadas (resultados no mostrados). Es importante resaltar que estas cuatro cepas poseen en su perfil de PCR alguno o algunos de los genes sugeridos como portadores de la actividad bioplagueada contra *S. frugiperda* (Tabla 2).

**Determinación de la CL50 de las cepas nativas promisorias.** La figura 3 y la tabla 2 muestran las CL50 de las cepas que fueron seleccionadas para este análisis por su mayor actividad bioplagueada en comparación con la cepa HD137. El rango de concentraciones empleado en la determinación de la CL50 osciló entre 0 y 1500 ng/cm<sup>2</sup> para todas las cepas. Vale la pena resaltar que únicamente las cepas IBUN10.2 e IBUN23.4 confirmaron su condición de presentar una CL50 inferior a la cepa de referencia. Resaltando la cepa IBUN23.4 por presentar dos veces más ac-

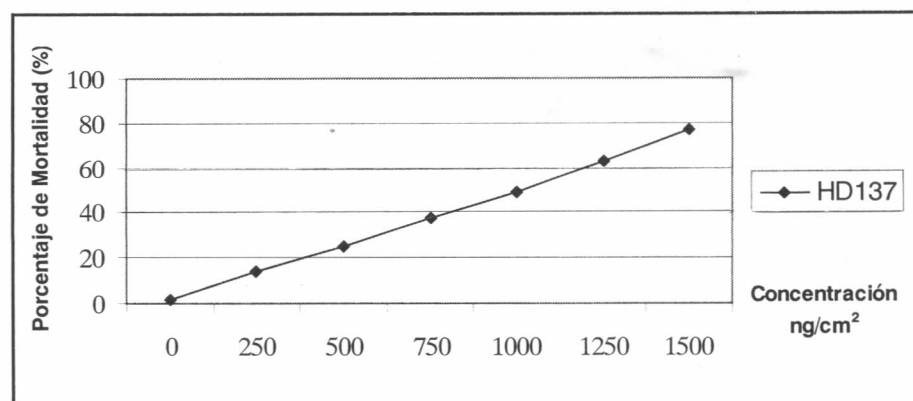


Figura 1. Estimación de la CL50 de la cepa de referencia Bt subespecie *aisawai* HD137.

Tabla 1: Características generales de las cepas nativas de *B. thuringiensis* del cepario del laboratorio de Biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia

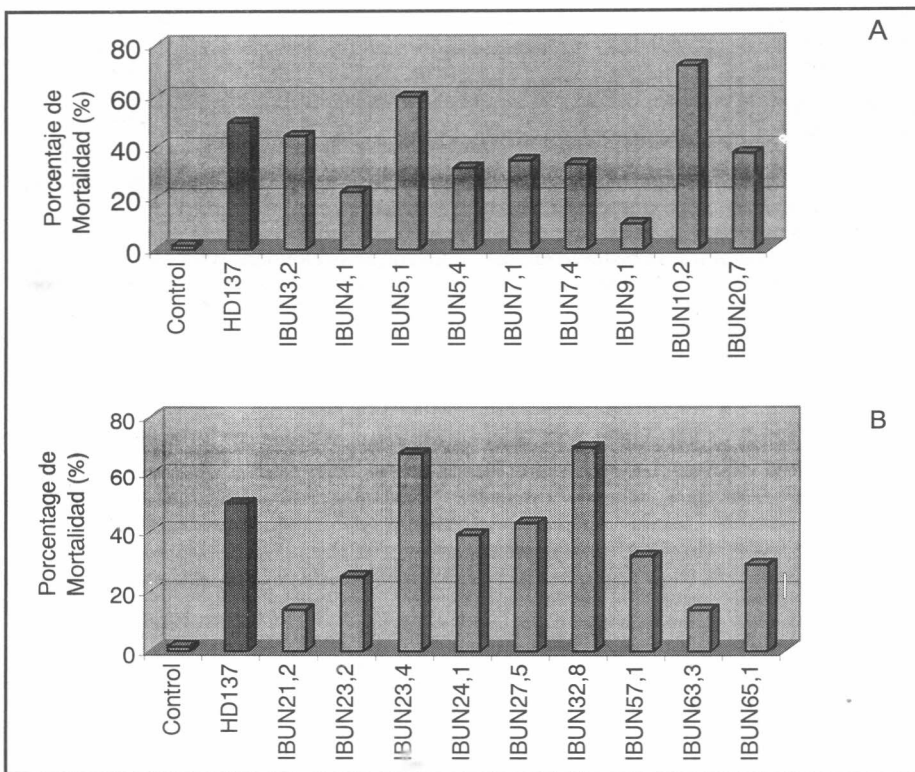
Cepas de Bt	Ecosistema de Procedencia	Forma del Cristal	Tamaño de PAC <sup>a</sup> (kDa)	Perfiles de PCR
HD-137	IBT-UNAM <sup>b</sup>	Romboide	130	1Aa,1Ab,1B,1C,1D
IBUN3.2	Fríjol	Bipiramidal	130-60	1Ab,1E
IBUN4.1	Papa/Fríjol	Triangular	130-60	1Ea
IBUN5.1	Maíz / Papa	Bipiramidal Triangular	130-60	1Ea
IBUN5.4	Maíz / Papa	Bipiramidal	130-60-40	1Ea
IBUN7.1	Otro	Triangular	130-60	1Ea
IBUN9.1	Pradera natural	Amorfo	Barrido	NA <sup>c</sup>
IBUN10.2	Pradera natural	Romboide	130	1Aa,1Ca,1Da
IBUN20.7	Arroz	Bipiramidal Triangular	130	1Ab,1Ea
IBUN21.2	Arroz	Romboide	130	1Aa,1Ab,1Ac,1C,1D
IBUN23.2	Arroz	Bipiramidal	160-60	1Aa,1Ab,1Ac
IBUN23.4	Arroz	Bipiramidal	130	1Aa,1Ab,1Ac,1D
IBUN24.1	Arroz	Bipiramidal	130-60	1Aa,1Ab
IBUN27.5	Arveja	Bipiramidal-Amorfo	130-60	1Aa,1Ab,1Ac
IBUN28.5	Frutales	Bipiramidal	130	1Aa,1Ab,1B,1C,1D
IBUN32.8	Papa	ND <sup>d</sup>	ND	1Aa,1Ab,1B,1C,1D
IBUN57.1	Pasto	Bipiramidal	130-60	1Aa,1Ab
IBUN63.3	Cebolla	Bipiramidal	130-60	1Aa,1Ab
IBUN65.1	Cebolla	Bipiramidal	130-60	1Aa,1Ab,

<sup>a</sup> Proteínas asociadas al cristal.

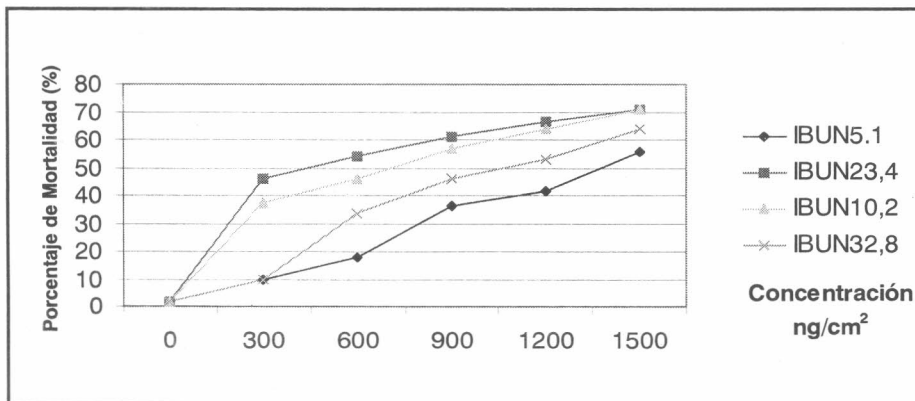
<sup>b</sup> Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México

<sup>c</sup> NA: No amplificó con ningún primer para genes *cry*

<sup>d</sup> ND: No determinado.



**Figura 2.** Panel A y Panel B muestran la actividad bioplaguicida de los aislamientos nativos evaluados a una concentración de 1000 ng/cm<sup>2</sup>. Igualmente se muestran los porcentajes de mortalidad del control negativo (tratamiento con agua destilada estéril) y la cepa de referencia *Bt aizawai* HD137.



**Figura 3.** Determinación de la CL50 de las cepas nativas de Bt con actividad bioplaguicida sobresaliente contra larvas de primer ínstar de *S. frugiperda*.

**Tabla 2.** Valores de la Concentración Letal Media de la cepa de referencia *Bt aizawai* HD137 y las cepas nativas con actividad bioplaguicida sobresaliente contra larvas de primer ínstar de *S. frugiperda*

Cepa	CL50 ng/cm <sup>2</sup>	Límite inferior (CL50)	Límite superior (CL50)
HD137	1012.5	874.9	1150.1
IBUN5.1	1415.5	1216.7	1614.3
IBUN32.8	1056.9	932.7	1222.6
IBUN10.2	635.6	480.1	786.3
IBUN23.4	437.9	227.0	526.0

tividad insecticida contra *S. frugiperda* en comparación con la cepa de referencia.

**Discusión**

Los resultados obtenidos con el método propuesto permitieron realizar una selección dirigida de aislamientos nativos de *B. thuringiensis* con actividad bioplaguicida contra larvas de *S. frugiperda*.

Un factor determinante para el éxito de este método, consistió en la baja variabilidad de los datos obtenidos. Esto se refleja en que de 7 ensayos realizados (con sus respectivas réplicas) con la cepa de referencia HD137, los valores de porcentaje de mortalidad variaron entre 42 y 54% a una concentración de 1000 ng/cm<sup>2</sup>. Esta variación es bastante aceptable para un sistema biológico de este tipo (Robertson *et al.* 1995). Otro punto crítico de este método consistió en la selección de aislamientos nativos de Bt cuyo análisis de PCR mostrara los genes *cry* activos contra *S. frugiperda*. Esto se realizó con el objeto de aumentar las probabilidades de encontrar aislamientos con buena actividad bioplaguicida. En la Tabla 1 y Figura 2 se observa que las cepas con mayor actividad bioplaguicida fueron aquellas que presentaron dentro de su genoma los genes *cry1C*, *cry1D* y/o *cry1E*, lo cual era de esperar de acuerdo con lo señalado en la literatura (Visser *et al.* 1990, Van Rie *et al.* 1990, Bohorova *et al.* 1997, Bravo *et al.* 1998). Sin embargo, cabe mencionar que algunas cepas que presentaban estos mismos genes (IBUN21.2 para el caso de *cry1C* y *cry1D* o IBUN4.1 e IBUN7.1 entre otras para el gen *cry1E*), no presentaron una actividad bioplaguicida sobresaliente. Esto se puede explicar por que una de las deficiencias que presenta la técnica de PCR que consiste en que si bien se puede medir la presencia de cierto contenido de genes *cry*, no asegura que dichos genes se encuentren activos ni la proporción en que se están expresando, respecto al resto de genes *cry* presentes en una cepa determinada (Masson *et al.* 1998).

Una forma de medir la eficiencia de un bioensayo, es por la capacidad de identificar el mayor número de cepas posible que cumplan con los intereses del estudio, revisando un menor número de aislamientos. Los resultados de este trabajo permitieron identificar, en un tamizaje inicial, cuatro cepas con actividad biopla-

guicida superior a la cepa de referencia. De éstas, dos cepas presentaron una CL50 superior a la HD137. Esto quiere decir que la estrategia propuesta permitió identificar 2 aislamientos, evaluando únicamente 20 cepas nativas (el 10%), que tienen un alto potencial agronómico desde el punto de vista de control de plagas. Esta efectividad es bastante alta si tenemos en cuenta otras estrategias como la de Martin y Travers 1989; Arango *et al.* 1999, donde luego de evaluar más de 1000 aislamientos no se puede más que mencionar cuáles de estos son o no activos contra un insecto blanco determinado, sin poder realmente cuantificar su potencial respecto a un patrón. O estudios como el de Hossain *et al.* (1997) donde no se emplea una cepa de referencia para validar los resultados. Por otra parte, la sensibilidad es otra característica importante en un bioensayo y es medida por la cantidad del principio activo (espora-cristal) necesario para estimar la actividad bioplaguicida. Las concentraciones de principio activo, empleadas en este estudio (1000 ng/cm<sup>2</sup>), están por debajo de otros trabajos que hablan de dosis superiores a 15 mg para determinar la actividad bioplaguicida sobre una larva (Theoduloz *et al.* 1997; Bosa y Cotes 1997).

Los resultados sugieren que Colombia presenta una alta variabilidad microbiana, específicamente en *B. thuringiensis*, la cual se refleja por el número de perfiles diferentes de PCR encontrados, 9 en sólo 20 cepas analizadas (Tabla 1). Valor bastante alto si tenemos en cuenta colecciones de Bt como la de Taiwan donde luego de analizar 225 cepas por PCR, únicamente se presentaron 5 perfiles de PCR diferentes (Chak *et al.* 1994). Además de su alta variabilidad existe un gran potencial agronómico en las cepas seleccionadas en este estudio por su actividad insecticida, ya que al menos la IBUN23.4 presenta el doble de actividad que la cepa patrón Bt *aizawai* HD137, la cual es una cepa empleada como referencia internacional para este tipo de estudios (Cerón *et al.* 1994; Bravo *et al.* 1998).

### Conclusiones

- El método presentado en este estudio para la determinación de la actividad bioplaguicida de aislamientos nativos de Bt, contra *S. frugiperda*, es reproducible, sensible y rápido.
- La técnica de PCR es una herramienta muy eficiente para seleccionar aislamientos nativos con potencial bioplaguicida, contra un insecto blanco al que se le conoce él o los genes a los que es susceptible, ya que ésta permite incrementar la efectividad del sistema de caracterización, permitiendo así la realización del bioensayo de forma más dirigida redundando en bajo costo del mismo.
- Los resultados sugieren que la cepa IBUN10.2 y especialmente la cepa IBUN23.4 poseen un gran potencial biopesticida con-

tra el insecto blanco *S. frugiperda*, por esta razón es recomendable realizar estudios conducentes a la estimación de dicho potencial al nivel de invernadero y campo.

### Agradecimientos

Esta investigación recibió apoyo de COLCIENCIAS y de la Universidad Nacional de Colombia. Los autores desean agradecer a estas instituciones sin cuyo apoyo no hubiese podido lograrse esta investigación.

### Literatura citada

- ARANGO, J.; GUTIÉRREZ, D.; ROMERO, M.; ORDUZ, S. 1999. Caracterización de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* de origen colombiano con actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). Resúmenes XXVI Congreso Sociedad Colombiana de Entomología. Bogotá: 134.
- BERNHARD, K.; JARRET, P.; MEADOWS, M.; BUTT, J.; ELLIS, D.J.; ROBERTS, G.M.; PAULI, S.; RODGERS, P.; BURGESS, H.D. 1997. Natural isolates of *Bacillus thuringiensis*: Worldwide distribution, characterization, and activity against insect pests. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 59-68.
- BOHOROVA, N.; CABRERA M.; ABARCA, C.; QUINTERO, C.; MACIEL, M.; BRITO, R.M.; HOISINGTON, D.; BRAVO, A. 1997. Susceptibility of four tropical lepidopteran maize pests to *Bacillus thuringiensis* Cry I type insecticidal toxins. *Journal of Economic Entomology* 1997. April. pp 412 - 415.
- BOSA, C.; COTES, A. 1997. Evaluación de la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda* (Smith). *Revista Colombiana de Entomología* 23 (3-4): 107-112.
- BRAVO, A.; SARABIA, S.; LÓPEZ, L.; ONTIVEROS, H.; ABARCA, C.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; LINA, L.; VILLALOBOS, F.; PEÑA, G.; NUÑES, M.; SOBERON, M.; QUINTERO, R. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12): 4965-4972.
- CHAK, K.F.; CHAO, D.C.; TSENG, M.Y.; KAO, S.S.; TUAN, S.J.; FENG, T.Y. 1994. Determination and distribution of cry-type genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (7): 2415-2420.
- CERÓN, J.; COVARRUBIAS, L.; QUINTERO, R.; ORTIZ, A.; ORTIZ, M.; ARANDA, E.; BRAVO, A. 1994. PCR analysis of the Cry I insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60 (1): 353-356.
- CERÓN, J.; ORTIZ, A.; QUINTERO, R.; GUERECIA, L.; BRAVO, A. 1995. Specific PCR primers directed to identify Cry I and Cry III genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Applied and Environmental Microbiology* 61 (11): 3826-3831.
- CHILCOT, C.N.; WIGLEY, P.J. 1993. Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from soil and insect habitats in New Zealand. *Journal of Invertebrate Pathology* 61: 244-247.

FEITELSON, J.S.; KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. *Bio/technology* 10: 271-275.

HOSSAIN, M.A.; AHMED, S.; HOQUE, S. 1997. Abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* in the agricultural soil of Bangladesh. *Journal of Invertebrate Pathology* 70: 221-225.

KAELIN, P.; MOREL, M.; GADANI, F. 1994. Isolation of *Bacillus thuringiensis* from stored tobacco and *Lasioderma serricorne* (F.) Applied and Environmental Microbiology 60 (1): 19-25.

LÓPEZ, A. 1986 Estudio básico para la cría de *Meteorus laphygmae* Viereck, parásito de *S. frugiperda*. Programa para graduados Universidad Nacional de Colombia - Instituto Colombiano Agropecuario (Tesis de Magister Science). Bogotá (Colombia). 101 p.

MARTÍN, P.; TRAVERS, R. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (10): 2437-2442.

MASSON, L.; ERLANDSON, M.; PULSTAI-CAREY, M.; BROSSEAU, R.; JUÁREZ-PÉREZ V.; FRUTOS, R. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64 (12): 4782-4788.

ORDUZ, S.; ROJAS, W.; CORREA, M.; MONTOYA, A.; DE BARJAC, H. 1992. A new serotype of *Bacillus thuringiensis* from Colombia toxic to mosquito larvae. *Journal of Invertebrate Pathology* 59: 99-103.

PERBAL, B. 1988. A practical guide to molecular cloning. Jhon Wiley & Sons. Segunda edición. p 38-46.

ROBERTSON, J.L.; RUSSEL, R.M.; SAVIN, N.E. 1980. POLO: A user's guide to probit or logit analysis. Gen. Tech. Rep. PSW-38. USDA, Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station, Berkeley, CA 94701 (15pp).

ROBERTSON, L.J.; PREISLER, H. K.; HICKLE LESLIE, N.G.S.S. 1995. Natural variation: A complication factor in bioassays with chemical and microbial pesticides. *Journal of Economic Entomology* 88 (1): 1-10

SALDARRIAGA, A.; POLAÑÍA, I.Z.; CÁRDENAS, R.; POSADA, L.; GARCÍA, F. 1987. Guía para el control de plagas. Instituto Colombiano Agropecuario. Sociedad Colombiana de Entomología. Cuarta Edición. Bogotá D.C Colombia. Pp 401.

SHAH, P.; GOETTEL, M. 1999. Directory of microbial control products and services. Society for Invertebrate Pathology. Microbial Control Division. p 31.

THEODULOZ, C.; ROMAN, P.; BRAVO, J.; PADILLA, C.; VÁSQUEZ, C.; MEZA-ZEPEDA, L.; MEZABASSO, L. 1997. Relative toxicity of native Chilean *Bacillus thuringiensis* strains against *Scrobipalpus absolutus* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Applied Microbiology* 82: 462-468.

TRAVERS, R.S.; MARTÍN, P.A.W.; REICHELDERFER, C.F. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp.

- Applied and Environmental Microbiology 53 (6): 1263-1266.
- VAN RIE, J.; Mc GAUGHEY, H.; JOHNSON, D.; BARNETT, B.; MELLARERT, H. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 247: 72-74.
- VÉLEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: Bionomía y manejo integrado. Ed. Universidad de Antioquia. 2ª Edición. Pp 482.
- VISSER, B.; MUNSTERMAN, E.; STOKER, A.; DIRKSE, W. 1990. A novel *Bacillus thuringiensis* gene encoding a *Spodoptera exigua* specific crystal proteins. J. Bacteriol. 172(12): 6783-6788.

Recibido: 07/00

Aceptado: 07/01