

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA CEPA LBT-25 DE *BACILLUS THURINGIENSIS* SOBRE OOTECAS DE *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

L. A. Torres, O. Fernández-Larrea y M. Escobar

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

RESUMEN

Se probó la actividad biológica de la cepa LBT-25 de *Bacillus thuringiensis* sobre ootecas jóvenes de *Meloidogyne incognita*. Un primer experimento fue diseñado para observar el efecto de un cultivo de esta cepa, a diferentes concentraciones, sobre las ootecas, y el segundo experimento estuvo dirigido a determinar la fracción activa presente en el cultivo. Ambos experimentos dieron como resultado que la cepa LBT-25 posee actividad ovocida sobre *M. incognita*, y esta se debe a una acción sinérgica entre los componentes del sobrenadante y la biomasa.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, δ -endotoxina, β -exotoxina, actividad biológica

ABSTRACT

Biological activity of *Bacillus thuringiensis* LBT-25 strain on youth oothecae of *Meloidogyne incognita* was proved. First experiment was designed to observe the effect of a culture from this strain, at different concentration, over oothecae. Second experiment was directed to determine the active fraction present in culture LBT-25 strain has ovocidal activity against *M. incognita* and that is result of a synergic action between component of floating part and biomass.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, δ -endotoxin, β -exotoxin, biological activity

INTRODUCCIÓN

Meloidogyne spp., dentro de los fitonemátodos, es uno de los principales agentes causantes de daños en cultivos, con pérdidas millonarias en la agricultura a escala mundial, reportándose solamente en las regiones tropicales con estimados que oscilan entre 11 y 25% de las cosechas [Sasser, 1979]. Existen diferentes estrategias de control, entre las cuales podemos mencionar la introducción de variedades resistentes, la rotación de cultivos y el uso de nematocidas químicos, entre otros [Atkinson, 1993]. Los nematocidas químicos han sido los más efectivos, pero se han limitado cada día más por su elevada toxicidad, que repercute en un profundo daño ambiental. Lo anterior ha motivado un incremento del control biológico dentro de programas de manejo integrado de fitonemátodos. El empleo de microorganismos entomopatógenos ha sido objeto de estudio en los últimos años, al grado que ya se tienen formulaciones comerciales de algunos de ellos, y son aplicados en varias miles de hectáreas en muchos países desarrollados [McCoy, 1990]. Entre los microorganismos que se reportan para el control de fito-

nemátodos se encuentra el hongo *Paecilomyces lilacinus* y las bacterias *Pasteuria penetrans* [Persis, A. et al., 1991], *Bacillus licheniformis* y algunas cepas de *B. thuringiensis* [Bone, L. W., 1989]. El presente trabajo aborda la detección de actividad nematocida sobre *M. incognita* en la cepa LBT-25 de *Bacillus thuringiensis* (Bt.).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa: Fue utilizada la cepa LBT-25 de Bt. perteneciente al cepario del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), conservada en cuña con agar nutritivo a 4°C.

Para las pruebas se emplearon cultivos obtenidos por agitación en zaranda a 140 rpm y 28-30°C en un medio caldo nutritivo [Oxoid. S.A.]. Los inóculos consistieron en suspensiones de esporas con una concentración inicial de 10^7 esp/mL. Los cultivos agitados se mantuvieron durante 48 horas, y posteriormente se separaron en cuatro variantes, para lo cual fue necesario

centrifugar a 6 000 rpm durante 20 minutos una parte del cultivo. Las variantes resultantes fueron las siguientes:

Variante 1: Consiste en el cultivo sin tratamiento alguno (10^8 esp/mL).

Variante 2: Consta de la biomasa (esporas y cristales) obtenida por centrifugación a 6 000 rpm, y luego resuspendida en solución salina (NaCl al 0,85%)

Variante 3: Constituye el sobrenadante del centrifugado, el cual está formado por todos los componentes extracelulares presentes en el medio de cultivo, incluyendo las toxinas bacterianas.

Variante 4: No es más que la variante 3 anteriormente tratada a 121°C y 1,5 atmósfera durante 15 minutos.

Bioensayos

Para los bioensayos con nemátodos se usaron ootecas jóvenes de *M. incognita* esterilizadas con NaOCl al 2%. Las ootecas se colocaron en vidrio reloj para posterior inoculación.

En el primer experimento se utilizó como inóculo la variante 1 a diferentes concentraciones (10^{-1} , 10^{-2} y sin diluir) bañando las masas de huevos en un volumen de 10 mL.

En el segundo experimento se utilizaron las restantes variantes como inóculo (Variantes 2, 3 y 4) usando el procedimiento anterior con el objetivo de determinar si el componente biocida era extra o intracelular.

En ambos experimentos el control agua estéril. Las evaluaciones se realizaron cada 48 horas durante 10 días observando el número de huevos eclosionados. Cada tratamiento fue replicado cinco veces en un diseño completamente aleatorizado.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayo 1

La cepa LBT-25 de *Bacillus thuringiensis* mostró actividad nematocida sobre las ootecas de *M. incognita*, evidenciado esto por el porcentaje de reducción de la eclosión de las ootecas en todas las diluciones de la variante 1 comparada con el control (Tabla 1). El mayor porcentaje de eclosión se observó a una concentración de 10^8 esp/mL. Este resultado concuerda con los trabajos de Sharma *et al.* en 1994 quien reporta actividad ovocida de *B. thuringiensis* sobre *M. incognita*.

Tabla 1. Efecto de la cepa de LBT-25 sobre ootecas de *M. incognita*

| | Variante 1 | Reducción de la eclosión (%) |
|---------|-----------------------------|------------------------------|
| LBT-25 | Sin diluir (10^8 esp/mL) | 100 |
| | 10^{-1} | 88 |
| | 10^{-2} | 66 |
| Control | Agua estéril | 0 |

Bioensayo 2

En el segundo ensayo se pudo observar que existe actividad tanto extra como intracelular, ya que en todas las fracciones hubo reducción de la eclosión (Tabla 2). La reducción de la eclosión por el sobrenadante puede es-

tar dada por la presencia de la β -exotoxina, lo que se evidenció en la fracción 3, ya que esta toxina es termolabile. Efectos nematostáticos y nematocidas de la β -exotoxina sobre fitonemátodos han sido reportados [Prasad *et al.*, 1972; Ignoffo y Dropkin, 1977; Bone, 1989; Noel, 1990].

Tabla 2. Efecto de las diferentes fracciones sobre ootecas de *M. incognita*

| | Variante | Reducción de la eclosión (%) |
|---------|-----------------|------------------------------|
| LBT-25 | V2(sin diluir) | 100 |
| | V2(10^{-1}) | 66,25 |
| | V3(sin diluir) | 100 |
| | V3(10^{-1}) | 68,12 |
| | V4(sin diluir) | 100 |
| | V4(10^{-1}) | 66,25 |
| Control | Agua estéril | 0 |

La biomasa debe su actividad fundamentalmente a la presencia de esporas y δ -endotoxina. Esta toxina pudo haber sido la responsable de la actividad biocida sobre *M. incognita* en el experimento, ya que han sido recientemente reportadas dos nuevas proteínas cristal (δ -endotoxina) activas contra nemátodos, la Cry V y Cry VI [Feitelson *et al.*, 1992], así como formulaciones comerciales que sólo contienen δ -endotoxinas y muestran actividad nematocida han sido recomendadas para el

control de fitonemátodos [Bone, 1989; Narva *et al.*, 1991], aunque no sobre *M. incognita*.

V2: biomasa; V3: sobrenadante tratado; V4: sobrenadante sin tratar; sin diluir = 10^8 esp/mL.

Estos bioensayos reflejan la existencia de una acción sinérgica entre la biomasa y el sobrenadante (Fig. 1). Diversos estudios han revelado la acción combinada entre la β -exotoxina, la δ -exotoxina y las esporas de un cultivo de *B. thuringiensis* contra larvas de insectos [Dubois, 1986].

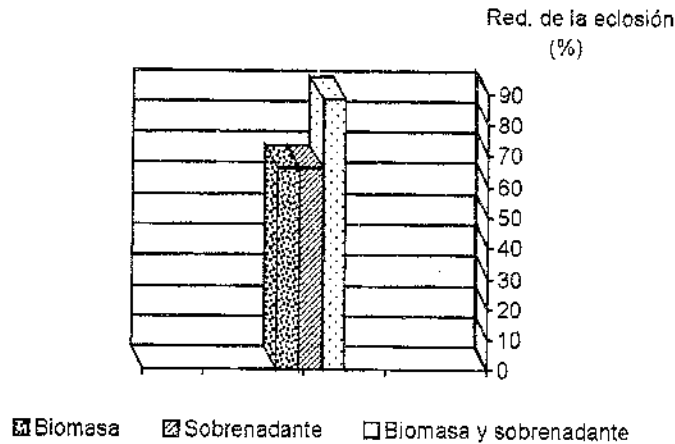


Figura 1. Sinergismo entre biomasa y sobrenadante.

CONCLUSIONES

- La cepa LBT-25 de *B. thuringiensis* posee actividad inhibitoria sobre las ootecas de *M. incognita*.
- Se encontró actividad tanto intra como extacelular (biomasa y sobrenadante), demostrándose una acción sinérgica entre ambas.

REFERENCIAS

- Atkinson, H. J.: *Oportunities for Plant Molecular Biology in Crop Production*, Monograph 55, 1993, pp. 257-256.
- Bone, L. W.: «Activity of Comercial *Bacillus thuringiensis* Preparation Against *Trichostrongylus colubriformis* and *Nippostrongylus brasiliensis*», *J. Invert. Pathology* 53:276-277, 1989.
- Dubois, N. R.: «Synergism Between β -exotoxin and *Bacillus thuringiensis* Subspecies *Kurstaki*(HD-1) in Gipsy Moth, *Lymantria dispar*, larvae», *J. Invert. Pathology* 48:146-151, 1986.
- Edwards, D. L.; J. Payne; G. G. Soares: «Novel isolates of *Bacillus thuringiensis* Having Activity Against Nematodes», *European Patent Application* 88: 307-309, 1989.

Feitelson, J. S.; J. Paynel; L. Kim: «*Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond», *Bio/Technol.* 10: 271-275, 1992.

Ignoffo, C. M.; V. H. Dropkin: «Deleterious Effects of the Thermostable Toxin of *Bacillus thuringiensis* on Species of Soil-inhabiting, Myceliophagus, and Plant-Parasitic Nematodes», *J. Kansas Ent. Soc.* 50: 394-398, 1977.

Narva, K.E. *et al.*: «Novel *Bacillus thuringiensis* Microbe Active Against Nematodes, and Genes Encoding Vowel Nematode-Active Toxins Cloned from *Bacillus thuringiensis* Isolates», *European Patent Application*, 1991

Noel, G. R.: «Evaluation of Thuringiensin for Control of Heterodera Glycines on Soybean», *Suppl. J. Nematol.* 22 (45): 763-766, 1990.

Prasad, S.; K. V. Tila; K. G. Gollakota: «Role of *Bacillus thuringiensis* on the Larval Survability and Egg Hatching of *Meloidogyne* spp., the Causative Agent of Root-Knot Disease», *J. Invertebr. Pathology* 20: 377-378, 1972.

Sasser, J. N.: *Root Knot Nematodes*, Ac. Press, Londres, 1979.

Sharma, R. D.: «*Bacillus thuringiensis*: a Biocontrol Agent of *Meloidogyne incognita* on Barley», *Nematol. Brasileira* 18: 79-84, 1994.