

CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA CONTRA *MELOIDOGYNE INCOGNITA*

María Elena Márquez,¹ Leonor Garmendía,² Emilio Fernández¹ y Mercedes Escobar¹

¹Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no.514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

²Facultad de Biología, Universidad de La Habana. Calle 25 no. 455, Ciudad de La Habana, CP 10400

RESUMEN

Bacillus thuringiensis (Berliner) es la bacteria entomopatógena más estudiada y extensamente utilizada como agente de control microbiano. El origen de su actividad como nematocida viene dado por el complejo de toxinas que produce durante su crecimiento, principalmente las δ -exotoxinas y δ -endotoxinas. En este trabajo se evaluó la toxicidad de seis cepas pertenecientes a la colección del INISAV sobre *Meloidogyne incognita* bajo condiciones in vivo. Los resultados muestran diferentes comportamientos entre las cepas, dado por la reducción de la infectividad de los nematodos. No hubo correspondencia entre el número de ootecas y la cantidad de nódulos presentes en las raíces, a consecuencia de un retardo en el momento de la infestación de los juveniles a las raíces. Las toxinas de *B. thuringiensis* provocaron efectos nematostáticos y desorientadores bajo las condiciones evaluadas.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, toxinas, efecto nematostático

ABSTRACT

Bacillus thuringiensis (Berliner) is the entomopathogenic bacterium more studied and broadly used as microbial control agent. Its nematocidal activity is caused by the toxin complex produced during the growth period, mainly δ -exotoxins and δ -endotoxins. This paper deal on the toxicity evaluation of six *B. thuringiensis* isolates of Plant Protection Research Institute (INISAV) collection against *Meloidogyne incognita* in vivo conditions. There were different behaviours between the isolates; they showed a reduction of the nematode infectivity. There were not correspondence between eggs masses and quantity of nodules also as a consequence of the delayed infection of roots *Bacillus thuringiensis* toxins produced nematostatic and disorientate effects under the evaluates conditions.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, *Meloidogyne incognita*, toxins, nematostatic effect

INTRODUCCIÓN

Los problemas y progresos en el desarrollo de estrategias para el control biológico de nematodos han sido revisados por Rodríguez-Kábana y Canullo (1992), Leyns *et al.* (1995) Kerry y Jafee (1997), entre otros. Dentro de los agentes de control biológico se destacan fundamentalmente los hongos del género *Arthrobotrys* [Cayrol, 1983] y las especies *Paecilomyces lilacinus* [Jonathan *et al.*, 2000] y *Verticillium chlamydosporium* [Siddiqui y Ehteshamul-Haque, 2000], mientras que en las bacterias se incluyen las especies *Bacillus thuringiensis* [Federici, 1999], *Pasteuria penetrans* [Somasekhar y Mehto, 2000] y *Bacillus licheniformis* [Márquez *et al.*, 1997].

Los bioinsecticidas derivados de *Bacillus thuringiensis* se han utilizado comercialmente por más de treinta y cinco años, y han sido aceptados como productos biodegradables y de uso seguro para los humanos, pues causan menos daño en el medio ambiente que los plaguicidas químicos tradicionales [Galán-Wong *et al.*, 1996].

Respecto a la efectividad de *B. thuringiensis* sobre nematodos, se presentan resultados desde la década del ochenta del siglo pasado, cuando se encontraron

efectos nematocidas de preparaciones comerciales formadas solamente de δ -endotoxina contra *Meloidogyne javanica* y *Tylenchulus semipenetrans* [Bone *et al.*, 1988]. No obstante, se atribuyen efectos nematostáticos sobre *Meloidogyne incognita* y *Heterodera glycines* según estudios realizados por Noel (1990), a causa de la δ -exotoxina, aunque debe señalarse que el mecanismo de acción de *B. thuringiensis* sobre nematodos es un tema aún muy controvertido.

Son pocos los estudios realizados en relación con la actividad de *B. thuringiensis* contra nematodos, e incluso sobre especies parásitas de plantas. La selección y evaluación de nuevos aislados de *B. thuringiensis* contra *M. incognita* contribuyen a disponer de cepas que serían caracterizadas para apoyar el desarrollo de nuevos bioproductos con tecnologías compatibles, de acuerdo con las necesidades y condiciones de Cuba [Fernández-Larrea, 1999].

En el presente trabajo se utilizan seis cepas de *B. thuringiensis* que fueron previamente evaluadas *in vitro* y seleccionadas por provocar efectos inhibitorios totales en la reducción de la eclosión de las masas de huevos

de *M. incógnita*. Asimismo, se observó que en las ootecas tratadas existían huevos detenidos en su desarrollo, otros necróticos y en algunos casos larvas con poca o ninguna reacción ante estímulos luminosos, vacuolizadas y con deformaciones en el sistema digestivo [Márquez *et al.*, 2001]. Un aspecto importante lo constituye la evaluación de la actividad biológica de estas cepas bajo condiciones semicontroladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se consideraron seis cepas de *Bacillus thuringiensis* pertenecientes a la colección de Bacterias Entomopatógenas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal (INISAV), conservadas en bulbos liofilizados a 4°C.

Reactivación de las cepas. Se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) [Sambrook *et al.*, 1989] hasta esporulación total. Una asada de cada cultivo se sembró en placas con agar nutriente (AN) (Oxoid CM3), y posteriormente se seleccionaron las colonias mediante observación de la morfología al microscopio estéreo (40X). Para determinar la presencia de esporas y cristales típicos de la especie se realizaron tinciones simples con violeta cristal (0,5%). De acuerdo con las características observadas, las colonias fueron sembradas en tubos con AN enriquecidos con extracto de levadura, durante 96 horas, a temperatura de incubación de $28 \pm 2^\circ\text{C}$.

Reproducción de los aislados de *B. thuringiensis*. Las suspensiones de las cepas se prepararon por el arrastre con solución salina al 0,85% del crecimiento formado en las cuñas agarizadas, las que fueron tratadas con temperatura de 60°C durante 15 minutos para eliminar las células vegetativas y homogeneizar el cultivo. A continuación se inocularon en erlenmeyers con capacidad de 500 mL con medio LB nutriente y se colocaron en una zaranda termostata BIOZART 2013, a un régimen de agitación de 140 rpm y una temperatura de $30 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta la formación de los cristales. La concentración final de los cultivos se determinó a través de conteos en cámara de Neubauer. Las muestras para los bioensayos fueron ajustadas hasta obtener caldos a una concentración del orden de 10^7 esporas/mL.

Evaluación del bioensayo. Durante el bioensayo se emplearon bandejas de poliespuma formadas por cubetas con capacidad de 125 g de suelo, previamente esterilizado. El suelo fue inoculado inicialmente con tres niveles de *Meloidogyne*: bajo = 1050 J2, medio = 2100 J2, y alto = 4200 J2. El riego se mantuvo diariamente para garantizar las condiciones de humedad adecuadas una semana antes de realizar la aplicación.

Fueron aplicados 15 mL de los cultivos de las diferentes cepas a una concentración de 10^7 esporas/mL por cubeta, 15 mL del nematicida fenamifos CS 240, y 15 mL de agua como testigo. El cálculo de la concentración del producto químico se hizo teniendo en cuenta la dosis em-

pleada para aplicación en hortalizas (1,5 g de ingrediente activo/m²). Cada variante fue replicada cinco veces y se efectuó un riego ligero con posterioridad a las aplicaciones. A los siete días se procedió a la siembra de las semillas pregerminadas de pepino (planta indicadora), y al cabo de las seis semanas las raíces fueron levantadas y colocadas en un recipiente con agua para eliminar los restos de suelo. Las evaluaciones realizadas fueron las siguientes:

A. Cálculo del grado medio de infestación según la fórmula:

$$Ia = \frac{\sum(a \times b)}{N - n}$$

donde: Ia: Grado medio de infestación.

a: Grados.

b: Cantidad de plantas/grado.

N: Cantidad de plantas observadas.

n: Cantidad de plantas sanas.

Los grados medios de infestación se determinaron de acuerdo con la escala de 0-5 de Taylor y Sasser (1978).

B. Presencia de ootecas en nódulos: Se cortaron 10 segmentos de raíces de 3 cm de longitud seleccionadas al azar para determinar la correspondencia entre el número de nódulos y la cantidad de masas de huevos presentes.

En el procesamiento estadístico de los datos se empleó el modelo de análisis de varianza y la prueba de Neuman-Keuls con transformación de los datos de porcentaje y con un 0,95% de nivel de significación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En todos los tratamientos con las cepas de *Bt*, los grados medios de infestación revelaron diferencias significativas respecto al testigo (Fig. 1), aunque los mejores resultados se obtuvieron con los niveles de inóculo inicial bajo y medio, en los cuales se logró una disminución del agallamiento entre 66 y 48% respectivamente.

Las cepas LBT-24 y LBT-25 mostraron los menores grados de infestación en ambos niveles de inóculo inicial (Grado 2), aunque no se observaron diferencias significativas con las cepas LBT-3, LBT-4 y LBT-47 en el nivel bajo ni con las cepas LBT-1 y LBT-4 en el nivel medio. Con el nivel más alto los resultados no fueron buenos, a pesar de que las cepas LBT-4 y LBT-24 provocaron la menor infestación.

El análisis general de la influencia de los tres niveles de inóculo inicial sobre la infestación alcanzada indicó que las cepas tuvieron diferencias significativas con el testigo en todos los casos. El sistema radical mostró un buen desarrollo, con las raíces principales y secundarias bien formadas, y se observó menor agallamiento en comparación con el testigo (Fig. 2).

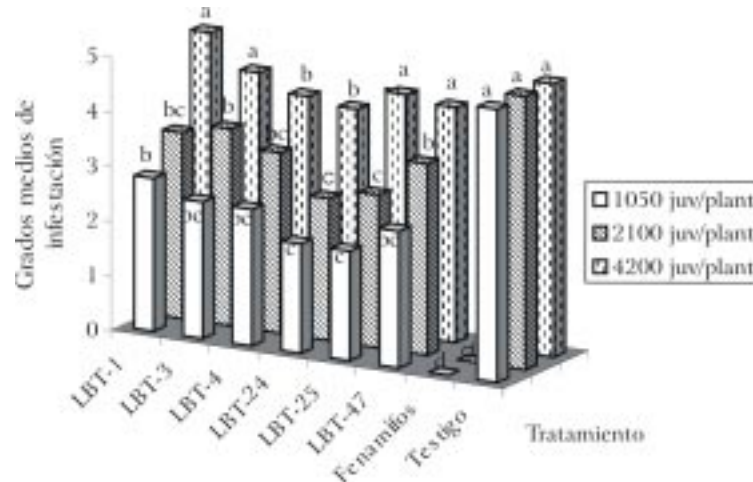


Figura 1. Grados medios de infestación obtenidos en cada tratamiento de acuerdo con el nivel de inóculo inicial.

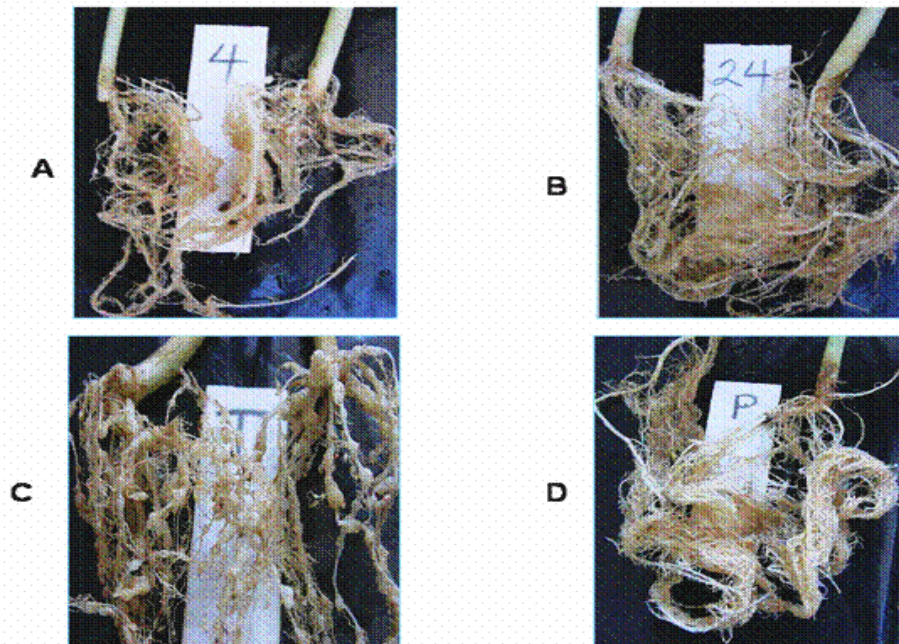


Figura 2. Morfología de las raíces tratadas con:
A. Ceba LBT-25, B. Ceba LBT-24, C. Agua, D. Fenamifos

En las plantas donde se aplicó el producto químico (fenamifos) no se apreciaron nódulos en las raíces; sin embargo, no se logró su crecimiento adecuado, lo cual pudo deberse a un efecto fitotóxico sobre la planta indicadora.

Zuckerman *et al.* (1993) aplicaron cultivos puros y formulados comerciales de las cepas CR-371 y CR-450 de *B. thuringiensis*, aisladas de suelos supresivos en Costa Rica, directamente sobre semillas, plantas y suelos para reducir los daños por *M. javanica* y *Tylenchulus semipenetrans*. Se

observó una disminución significativa de las agallas de las raíces en comparación con el control no tratado. Las cepas no causaron fitotoxicidad ni patogenicidad a las plantas tratadas (tomate y plátano) en condiciones semicontroladas y en experimentos de campo.

En la Fig. 3 se observa que, al aumentar el nivel de inóculo inicial, se incrementó el porcentaje de ootecas presentes en los nódulos de las raíces como consecuencia de una reproducción acelerada de los ejemplares que lograron penetrarlas y completar su ciclo de vida.

No se observó una correspondencia entre la cantidad de nódulos y el número de ootecas desarrolladas presentes, lo que sugiere que la penetración de las larvas no ocurrió al mismo tiempo y que hubo un retardo en la invasión, ya

que el número de nódulos con ootecas fue bajo comparado con el testigo. Una inhibición igual en la penetración de *M. javanica* en raíces de tomate fue observada por Sharma *et al.* (1996) en tratamientos con *B. thuringiensis*.

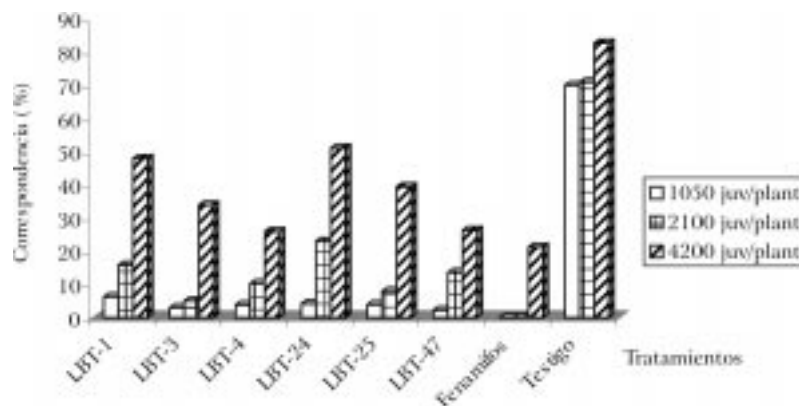


Figura 3. Correspondencia entre cantidad de nódulos y presencia de ootecas en segmentos de 3 cm de raíces (expresado en por ciento).

Debe considerarse que todos los nódulos se encontraban bajo las mismas condiciones, excepto por la presencia de las diferentes toxinas de *B. thuringiensis* que se formaron durante el desarrollo de la bacteria. Esto indica que las toxinas provocaron efectos nematostáticos y desorientadores [Carneiro, 1998] que interfirieron en la búsqueda y penetración efectiva de las larvas infestantes del segundo estadio, lo cual constituye un elemento importante, ya que el cultivo agrícola estaría sometido a una menor cantidad de nematodos por unidad de tiempo, en su fase inicial de desarrollo, principalmente si la aplicación se hace de manera preventiva, en busca del efecto sobre las larvas infectivas presentes en el suelo.

Han sido observadas diferencias en cuanto a la actividad nematocida sobre los distintos estadios de los nematodos. Se señala que, aparentemente, los aislados de *B. thuringiensis* con actividad ovicida ocurren más frecuentemente; sin embargo, Leyns *et al.* (1995) observaron una alta mortalidad en juveniles eclosionados y adultos de *C. elegans*, y por el contrario no hubo actividad ovicida.

Se afirma que entre las bacterias de mayor empleo para el control biológico de nematodos se encuentra *B. thuringiensis*, con reportes de cepas altamente eficientes como las ATCC 55273 y ATCC 55275 [Current Drugs Patents, 2000]. Existen varias patentes sobre el tema que reivindican las toxinas y los genes responsables de la actividad nematocida. En dependencia de la cepa cultivada, pueden actuar no solo contra nematodos, sino también contra lepidópteros, coleópteros y dípteros.

Una de las ventajas del uso de productos a partir de *B. thuringiensis* respecto a los nematocidas es que puede apli-

carse en cualquier fase del desarrollo del cultivo, aunque las plantaciones estén en plena cosecha. En sentido general, una adecuada aplicación y un correcto manejo del biopreparado pueden tener un mejor efecto nematocida e incrementar los rendimientos a largo plazo con respecto a los productos químicos [Gowen, 2001].

CONCLUSIONES

- Las cepas LBT-24 y LBT-25 provocaron los menores valores de grados medios de infestación en los niveles de inóculo inicial bajo y medio.
- Los tratamientos bajo condiciones *in vivo* de las cepas nematocidas disminuyeron los niveles de infestación respecto al testigo, y las raíces mostraron un buen desarrollo en todos los casos.
- Los tratamientos con *B. thuringiensis* retardaron la penetración de los juveniles a las raíces al no existir una correspondencia entre la cantidad de nódulos y el porcentaje de ootecas presentes en ellos.

REFERENCIAS

- Bone, L. W.; K. P. Botter; S. S. Gilol: «Factors Affecting the Larvicidal Activity of *B. thuringiensis* Toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda)», *J. Invert. Pathol.*, 52:102-107, 1988.
- Carneiro, R. M. D. G.; I. S. Souza; L. C. Belarmino: «Actividad nematocida de cepas de *Bacillus* spp. a juveniles de *Meloidogyne javanica*», *Nematología Brasileira*, 22(1):12-21, 1998.
- Cayrol, J. C.: «Biological Control of *Meloidogyne incognita* with *Arthrobotrys irregularis*», *Revue de Nematologie*, 6:265-273, 1983.
- Current Drugs Patents. [en línea] <http://Chemweb.com> [Consulta: 9 de mayo de 2002].

- Federici, B. A.: «*Bacillus thuringiensis* in Biological Control», *Handbook of Biological Control*, T. S. Bellows and T. W. Fisher, Academic Press, San Diego, 1999, pp. 575-712.
- Fernández-Larrea, O.: «Aislamiento, selección y estudio de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario». Informe Final, INISAV, 1999.
- Galán-Wong, L. J.; C. Rodríguez; H. A. Luna: *Avances recientes en la biotecnología en Bacillus thuringiensis*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México, 1996.
- Gowen, S. R. [en línea] Chemical Control of Nematodes. Efficiency and Side Effects. <http://www.fao.org/docrep/v9978e/v997e08.htm> (Consulta: 9 de diciembre de 2002)
- Jonathan, E. I.; R. Arulmozhiyan; S. Muthusamy; W. W. Manuel: «Field Application of *Paecilomyces lilacinus* for the Control of *Meloidogyne incognita* on Betelvine, Piper Betle», *Nematol. Medit.*, 28:131-133, 2000.
- Kerry, B. R.; B. A. Jaffee: «Fungi As Biological Control Agents for Plant Parasitic Nematodes», *The Mycota IV Enviromental and Microbial Relationship*. Wicklow / Soderstrom (eds). Springer-Verlag, Berlín, Heidelberg, 1997.
- Leyns, F.; G. Borgonie; G. Arnaut; D. De Waele: «Nematicidal Activity of *B. thuringiensis* isolates», *Fundam. Appl. Nematol.* 18 (3):211-18, 1995.
- Márquez, M. E.; V. García; O. Fernández-Larrea; M. Escobar: «Efecto nematocida de *Bacillus licheniformis*. Estudio preliminar». *Rev. Protección Veg.*, vol 12(2): 95-98. 1997.
- Márquez, M. E., L. Garmendía, E. Fernández; M. Escobar: «Cepas de *B. thuringiensis* promisorias en el control de *Meloidogyne incognita*», *Nematrópica*, vol. 31, no.2, 2001.
- Noel, G. R.: «Evaluation of thuringiensin of *H. glycines* on Soybean», *J. Nematol.*, 22(4s):763-766, 1990.
- Rodríguez-Kábana, R.; G. H. Canullo: «Cropping System for the Management of Phytonematodes», *Phytoparasitica*, 20:211-224, 1992.
- Sambrook, J.; E. F. Fritsch; T. Maniatis: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Sharma, R. D.; A. C. Gómez: «Effect of Seed Treatment with Delta Endotoxins of *Bacillus* spp on the Multiplication of Heterodera Glycines on Soybean and Corn», *Nematol. Bras.*, 20:21-29, 1996.
- Siddiqui, I. A.; S. Ehteshamul-Haque: «Effect of *Verticillium chlamydosporium* and *Pseudomonas aeruginosa* in the Control of *Meloidogyne javanica* on Tomato», *Nematol. Medit.*, 28:193-196, 2000.
- Somasekhar, N.; V. K. Mehto: «Infectivity of *Pasteuria penetrans* to Entomophatogenic Nematodes», *Nematol. Medit.*, 28:13-14, 2000.
- Taylor, A. L.; J. B. Sasser: *Biology, Identification and Control of Root-Knot Nematodes (Meloidogyne species)*, 111. Dept. Pl. Pathol., N. C. State Univ., Raleigh, 1978.
- Tzortzakakis, E. A.; A. G. D. R. Channer; S. R. Gowen; R. Ahmed: «Studies on the Potencial Use of *Pasteuria penetrans* As a Biocontrol Agent of Root-Knot Nematodes (*Meloidogyne* spp.)», *Plant Pathology*, 46:44-55, 1997.
- Ziniu, Y.; H. BiWang: «Biocontrol of Plant-Parasitic Nematodes by Bacteria», *Journal of Fujian Agricultural University* 27:3, 316-321, 1998.
- Zuckerman, B. M.; M. B. Dickow; N. Acosta: «A Strain of *B. thuringiensis* for the Control of Plant Parasitic Nematodes», *Biocontrol of Sciences and Technologies* 3 (1):41-46, 1993.