

POTENCIAL PARA DESARROLLAR TOLERANCIA A LAS DELTAENDOTOXINAS DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* EN *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

M. A. Silva-Flores¹; O. Díaz-Gómez¹; N. Bautista-Martínez^{2†}; J. C. Rodríguez-Maciél²;

¹Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Álvaro Obregón Núm. 64 San Luis Potosí, San Luis Potosí. C. P. 78000, MÉXICO.

²Instituto Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México. C. P. 56230, MÉXICO. (†Autor responsable).

RESUMEN

El presente estudio demuestra el potencial de *Plutella xylostella* L. para desarrollar tolerancia a las entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Btk.) Las poblaciones bajo estudio fueron una susceptible y otra sometida a presión de selección. La primera se crió durante ocho generaciones sin ningún tratamiento de insecticida, a la novena generación se le estimó la concentración letal mediana y la 65; con la segunda se inició la selección de la población tratada con Btk. Cuatro generaciones continuas de la población resistente se expusieron a la concentración de Btk correspondiente a la CL_{65} estimada en la población susceptible de *P. xylostella*. La entomotoxina utilizada en el experimento correspondió a Btk formulada al 6.4 % (Javelin® WG, Novartis México). En los bioensayos, se cortaron discos de hojas de col (*Brassica oleracea* L.) de 90 mm de diámetro, se sumergieron durante 10 segundos en diferentes concentraciones de entomotoxinas y en cajas petri se infestaron con larvas de tercer instar; se trataron 10 larvas por concentración con tres repeticiones respectivas, el porcentaje de mortalidad se cuantificó 48 horas después. El análisis de los datos se realizó asumiendo el modelo Probit, mediante regresión lineal y usando el programa PcProbit; con él se estimó la CL_{50} , CL_{65} , y la CL_{95} . Además se calculó la resistencia relativa. Los resultados indican que el porcentaje de mortalidad de *P. xylostella* disminuye más del 50 % después de ser sometida a presión de selección y el factor de tolerancia obtenido fue de aproximadamente 14 veces.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: dorso de diamante, resistencia a insecticidas, toxinas, bioensayos.

POTENTIAL TO DEVELOP TOLERANCE TO DELTAENDOTOXINS OF *Bacillus thuringiensis* subsp. *Kurstaki* IN *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae)

ABSTRACT

This study demonstrates the potential of *Plutella xylostella* L. to develop tolerance to entomotoxins from *Bacillus thuringiensis* Subsp. *kurstaki* (Btk.) One susceptible population and one subjected to selection pressure were studied. The first was reared for eight generations without insecticide treatment; for the ninth generation a medium lethal concentration was estimated at 65. Selection of the second population began with Btk treatment. Four continuous generations of the resistant population were exposed to the LC_{65} concentration estimated for the susceptible population of *P. xylostella*. The entomotoxin used in the experiment was a 6.4 % formula of Btk (Javelin® WG, Novartis México). In the bioassays, 90 mm diameter discs of cabbage (*Brassica oleracea* L.) leaves were cut, submerged for 10 seconds in different concentrations of entomotoxins, and placed in Petri dishes where they were infested with third instar larvae, ten larvae per concentration with three replications. The percentage of mortality was quantified 48 hours later. Data analysis was performed using the Probit model. With linear regression in the PcProbit software LC_{50} , LC_{65} , and LC_{95} were estimated, and relative resistance was calculated. The results indicate that the percentage of mortality of *P. xylostella* decreases more than 50 % after being subjected to selection pressure and the tolerance factor obtained was approximately 14 times greater.

ADDITIONAL KEY WORDS: diamond back, resistance to insecticides, toxins, bioassay.

INTRODUCCIÓN

La resistencia de los insectos a los insecticidas es uno de los problemas más serios en la agricultura. Una población es considerada resistente cuando los individuos que la constituyen han desarrollado la capacidad para no ser afectados por la aplicación de esta clase de xenobiotas (Georghiou y Taylor, 1977). La resistencia a insecticidas tiene consecuencias sociales, económicas y ecológicas; y se traduce en aumento de los costos de producción. Además, se incrementan los índices de contaminación, y en los casos más extremos, genera el abandono de áreas de cultivo o cambios en la vocación de las actividades agrícolas con repercusiones sobre el desempleo (Díaz y Rodríguez, 2001).

Por las ventajas ecológicas y eficiencia para el control de plagas se consideró a los bioinsecticidas como la solución al problema de resistencia; debido a que se creía poco probable que un insecto logrará desarrollar algún tipo de tolerancia a esta clase de productos (McGaughey, 1985). Sin embargo, se ha demostrado en más de una ocasión que este problema es extensivo hacia cualquier agente de selección de insectos, y se manifiesta por el mal uso de los mismos, incluyendo a las delta endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* Berliner (Tabashnik, 1994).

En la actualidad existen diferentes casos de resistencia a *B. thuringiensis*. La palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.), es la primer especie de insecto que a nivel mundial se consigna como resistente en el campo a las delta endotoxinas contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* (Tabashnik *et al.*, 1990; Shelton *et al.*, 1993). Situaciones similares son la resistencia de *Leptinotarsa decemlineata* (Say) y otras cinco especies de coleópteros colectados en Michigan, Arizona, Maryland y Nueva York, EEUU, a las contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. Por otro lado, *Aedes aegypti* L. en Brasil, la mosca negra *Simulium damnosum* Theobald en el Oeste de África y *Aedes vexans* Meigen en Alemania, están consignados como resistentes a las contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* (Tabashnik, 1994).

Considerando que *P. xylostella* está citada como resistente a más de 46 insecticidas en el mundo, que en México es la plaga principal de las crucíferas, sometida a presión de selección con diferentes plaguicidas, incluyendo *B. thuringiensis*, y que es creciente el número de productores que dependen de su uso para controlar plagas, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el potencial para desarrollar tolerancia a las deltaendotoxinas contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* en una población de *P. xylostella* recolectada en el estado de San Luis Potosí, México.

MATERIALES Y MÉTODOS

Insectos

Las poblaciones de *P. xylostella* estudiadas fueron

una susceptible, sin historial de selección, y otra sometida a presión de selección, se formaron a partir de aproximadamente 500 larvas y/o pupas recolectadas durante los meses de abril a junio, en campos de crucíferas establecidos en los municipios de San Luis Potosí y Soledad de Graciano Sánchez, San Luis Potosí, México. En esta región el control de *P. xylostella* se hace mediante insecticidas convencionales, pocos productores de crucíferas utilizan *B. thuringiensis*. La cámara de cría para el desarrollo de las poblaciones experimentales se mantuvo a 29 ± 2 °C, humedad relativa entre 55 y 65 % y fotoperíodo de 12:12 horas luz oscuridad.

Las pupas se introdujeron en jaulas para emergencia y apareamiento de adultos. Los cuales se alimentaron con una solución de sacarosa a 10 %. En la jaula se introdujo diariamente una maceta con plántulas de col para la colecta de huevos, reemplazándola cada 24 horas. Una vez que se retiró la maceta, se introdujeron en una caja de plástico de 25 x 10 x 15 cm, y se tapó con tela de organza. Las larvas se alimentaron con hojas de col que se reemplazaron cada 24 horas, hasta que las larvas alcanzaron el peso y tamaño requerido para la realización de los bioensayos o selección.

Población Susceptible (PxSuc)

Antes de hacer cualquier evaluación, la población recolectada en campo se crió durante ocho generaciones sin presión con algún tratamiento de insecticida convencional o microbial. En la nueva generación de laboratorio se estimaron la concentración letal mediana y la 65. La segunda fue usada para el proceso de selección de la población tratada con *B. thuringiensis* y la mediana para comparar la evolución de la resistencia en la población seleccionada.

Selección de la población resistente (PxRes)

Se desarrolló a partir de la población colectada en un rancho particular en donde se utiliza con frecuencia *B. thuringiensis* para el control de *P. xylostella*. A cuatro generaciones continuas de laboratorio se les aplicó la CL_{65} estimada en la población susceptible.

Se cortaron 20 discos de hojas de col (*Brassica oleracea*), de aproximadamente 90 mm de diámetro y se sumergieron durante 10 segundos en una solución que contenía la CL_{65} estimada en la Población PxSuc. Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente por una hora, para posteriormente colocarlos individualmente en cajas petri e infestarlos con 20 las larvas de tercer ínstar temprano. En total se trataron aproximadamente 400 larvas por generación y evento de selección, realizándose de tres a cinco repeticiones de cada uno. La mortalidad se cuantificó 48 horas después del tratamiento, utilizando el mismo criterio de mortalidad que para los bioensayos. Los individuos sobrevivientes se conservaron en hojas de col sin tratamiento de insecticida, para continuar con la

siguiente generación y selección. Después de la cuarta selección, en la quinta generación de sobrevivientes, se estimó la CL₅₀ y la CL₉₅.

Entomotoxinas

Para los bioensayos y como agente de selección se usó el complejo de entomotoxinas contenidas en *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki*, formuladas comercialmente como gránulos dispersables, a una concentración de ingrediente activo del 6.4 % (Javelin® WG Novartis, México).

Bioensayos

Los bioensayos se realizaron siguiendo la técnica de residuos en hojas propuesta por Tabashnik *et al.* (1990) con ligeras modificaciones. Se cortaron discos de hojas de col de aproximadamente 90 mm de diámetro y se sumergieron durante 10 segundos en una solución con las diferentes concentraciones de entomotoxinas. Los discos se dejaron secar a temperatura ambiente por una hora, para posteriormente colocarlos individualmente en cajas petri e infestarlos con larvas de tercer instar temprano. Se trataron 10 larvas por concentración y se hicieron tres repeticiones de cada una. La mortalidad se cuantificó 48 horas después del tratamiento, utilizando como criterio de mortalidad la reacción de la larva al ser punzada suavemente en la cabeza y/o último segmento abdominal, las larvas que se mantuvieron inmóviles o presentaron movimientos anormales se consideraron muertas.

Análisis

El análisis del porcentaje de mortalidad se realizó asumiendo el modelo Probit, mediante regresión lineal, usando el programa PcProbit (Camacho, 1990), con el que se estimó la CL₅₀, CL₆₅ y la CL₉₅, así como sus límites de confianza y la pendiente de cada línea de regresión. La respuesta de dos poblaciones se consideró significativamente diferente si los valores de sus límites de confianza al 95 % no se superaron. La resistencia relativa (RR) se calculó dividiendo la CL₅₀ de la población seleccionada o una de campo de *P. xylostella*, entre la CL₅₀ de la susceptible o la de Geneva 88.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este trabajo se muestra el potencial de la población de *P. xylostella* recolectada en el estado de San Luis Potosí para desarrollar tolerancia a las entomotoxinas contenidas en la subespecie *kurstaki* de *B. thuringiensis*. Después de cuatro generaciones seleccionadas, en la población PxRes se estimó una mortalidad de 15 %, comparada con 70 % que se observa en la que se consideró primera generación de la población (Cuadro 1). Es decir, en cuatro generaciones tratadas con 0.64 mg de ingrediente activo (i.a) por litro la susceptibilidad disminuyó aproximadamente 55 %.

CUADRO 1. Evolución del porcentaje de mortalidad en *Plutella xylostella* sometida a presión de selección con entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki*.

Generación	Larvas Tratadas	Larvas Sobrevivientes	Sobrevivientes (%)	Mortalidad (%)
1	1850	562	30.54	69.54
2	1310	720	54.96	45.03
3	1900	1402	73.78	26.21
4	1950	1650	83.61	15.38

En la comparación de las concentraciones letales estimadas en ambas poblaciones, se obtuvo diferencia estadística significativa, los límites fiduciales no se traslapan a nivel de 95 %. La CL₅₀ en la población PxSuc fue 0.30 mg·litro⁻¹ de i.a., mientras que su CL₉₅ fue 8.20 mg·litro⁻¹ de i.a., estos valores se incrementan notablemente en la población que se sometió a presión de selección durante cuatro generaciones; sus valores de CL₅₀ y CL₉₅ pasaron a 4.1 y 69.39 mg·litro⁻¹ de i.a., respectivamente, mostrando que aumentó la tolerancia a las entomotoxinas (Cuadro 2). También se puede apreciar el valor bajo de la pendiente de población PxSuc (1.14), indicativo de una mayor heterogeneidad en su constitución genética respecto a PxRes, cuya pendiente fue 1.34. Esto significa que la población recolectada en campo contenía individuos portadores de alelos de resistencia pero que fenotípicamente se comportaban como susceptibles.

El valor de la pendiente más alto en la población PxRes, es un índice de la homogenización de la población después de la selección, al concentrar una mayor frecuencia de genes de resistencia en ella, lo cual, combinado con un mayor valor de CL₅₀ y CL₉₅ muestran el potencial para llevar a cabo una microevolución hacia la resistencia a las entomotoxinas contenidas en la subespecie *kurstaki* de *B. thuringiensis* (Chilent y Tabashnik, 1995).

CUADRO 2. Diferencias en susceptibilidad de una población de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis*.

Población	CL ₅₀ (mg litro ⁻¹ de i.a.)	Límites de confianza (mg.litro ⁻¹ de i.a.)	CL ₉₅ (mg.litro ⁻¹ de i.a.)	Límites de confianza	Pendiente
Susceptible	0.30	0.19-0.46	8.20	3.86-27.09	1.14
Resistente	4.11	2.95-5.79	69.39	38.04-68.40	1.34

Resistencia Relativa

La concentración letal mediana, CL₅₀, estimada en la población PxRes, muestra que después del proceso de selección los individuos fueron 13.7 veces más tolerantes respecto a población PxSuc, mientras que a nivel de CL₉₅ lo fueron 8.5 (Cuadro 3). Lo anterior significa que para manejar poblaciones sometidas a frecuentes presiones de

selección se requieren concentraciones cada vez mayores del bioinsecticida.

CUADRO 3. Resistencia relativa de una población de *Plutella xylostella* sometida a presión de selección con entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*.

Población	CL ₅₀ (mg·litro ⁻¹ de i.a.)	Resistencia Relativa	CL ₉₅ (mg·litro ⁻¹ de i.a.)	Resistencia Relativa
Susceptible	0.30	1.0 x	8.20	1.0 x
Resistente	4.11	13.7 x ³	69.39	8.4 x

La mortalidad estimada a nivel de CL₅₀ muestra que la población PxSuc es menos susceptible que la población Geneva 88 (Shelton *et al.*, 1993). Estos investigadores estimaron una CL₅₀ de 0.02 mg·litro⁻¹ de i.a., mientras que la CL₅₀ de la población PxSuc es 0.30 mg·litro⁻¹ de i.a. equivalente a 15 veces la citada para la población Geneva 88. Una posible razón es que Shelton *et al.* (1993) emplearon larvas de segundo ínstar tardío, que pesan en promedio entre 0.2 y 0.4 mg por larva; mientras que en este experimento se usaron larvas de tercer instar, más grandes y pesadas. En cambio, las poblaciones Km y Lab-P, citadas por Tabashnik *et al.* (1990), resultaron más tolerantes que el estándar susceptible usado en esta investigación, la población PxSuc. Las primeras tienen una CL₅₀ de 1.56 y 1.76 mg·litro⁻¹ de i.a., respectivamente, que equivale a 5.2 y 5.8 veces la CL₅₀ requerida en la población PxSuc (Cuadro 4). Estos datos son más concordantes entre ellos, dado que en ambas investigaciones se emplearon larvas de tercer ínstar; las pequeñas variaciones pueden ser resultado de la diversidad genética que se da entre poblaciones de la misma especie, característico del aislamiento geográfico de las mismas (González *et al.*, 2001).

Por otro lado, los valores de tolerancia consignados por Shelton *et al.* (1993) y Tabashnik *et al.* (1990) en las

poblaciones resistentes son mayor a los obtenidos en esta investigación (Cuadro 4). Lo anterior se basa en el cálculo de la resistencia relativa a las entomotoxinas de *B. thuringiensis*. La población PxRes es 205.5 veces más tolerante que Geneva 88, mientras que la población NO 80, reportada por Tabashnik *et al.* (1990), lo es 3,195. La diferencia resulta de la fuerte dependencia que se hace de *B. thuringiensis* para controlar *P. xylostella* en Hawaii, ya que NO 80 recibió por lo menos 50 aplicaciones en campo antes de su colecta y un máximo de 400 en últimos 8 años; las aspersiones fueron básicamente con diferentes aislamientos de *B. thuringiensis*. Entre tanto, la población PxRes sólo se trató por cuatro generaciones continuas en laboratorio, lo que muestra el potencial que tienen algunas poblaciones de *P. xylostella* para desarrollar resistencia a los insecticidas microbiales derivados de las entomotoxinas de *B. thuringiensis* subs. *kurstaki*. Este resultado alerta sobre los riesgos que implica la amplia adopción de plantas transgénicas sin apropiadas estrategias de manejo.

CONCLUSIONES

La investigación muestra el potencial de una población de *P. xylostella* colectada en el estado de San Luis Potosí, México, para desarrollar tolerancia a las entomotoxinas contenidas en *B. thuringiensis* subs. *kurstaki*. El porcentaje de mortalidad de esta población disminuyó más de 50 % después de ser sometida a presión de selección, y la tolerancia desarrollada fue de aproximadamente 14 veces. El aumento en la frecuencia de genes de resistencia demuestra la imperante necesidad de establecer estrategias encaminadas a manejar su evolución, pues la pérdida de *B. thuringiensis* significa aumento en los riesgos de contaminación y afecta la sostenibilidad del manejo de plagas en crucíferas.

LITERATURA CITADA

CAMACHO C., O. 1990. PcProbit. Versión 1.0 (Programa de Computo). Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados.

CUADRO 4. Resistencia relativa a *Bacillus thuringiensis* subs. *kurstaki* en diferentes poblaciones de *Plutella xylostella* L.

Población	CL ₅₀ (mg·litro ⁻¹ de i.a.)	Límites de confianza	Pendiente	Resistencia relativa	Referencia
Geneva 88	0.02	0.01-0.03	2.58	1.0	Shelton <i>et al.</i> (1993)
PxSuc	0.30	0.46-19.00	1.14	15.0	Este estudio
Km	1.56	0.08- 2.57	1.30	78.0	Tabashnik <i>et al.</i> (1990)
Lab-P	1.76	1.05- 2.89	1.76	88.0	Tabashnik <i>et al.</i> (1990)
PxRes	4.11	2.90- 5.74	1.39	205.5	Este estudio
SO 86-87	10.20	5.70-16.90	1.20	510.0	Tabashnik <i>et al.</i> (1990)
SO 89	24.10	17.70-32.20	1.60	12.0	Tabashnik <i>et al.</i> (1990)
Loxahat(a)	32.83	22.70-53.95	1.19	1641.5	Shelton <i>et al.</i> (1993)
NO 80	69.39	46.10-89.00	1.38	3195.0	Tabashnik <i>et al.</i> (1990)

Montecillo, México.

- CHILENTT C. F.; TABASHNIK, B. E. 1995. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration-mortality line: are they related?. *J. Econ. Entomol.* 88: 11-20.
- DÍAZ G., O.; RODRÍGUEZ M., J. C. 2001. Resistencia a insecticidas: conceptos y procedimientos generales para su manejo, pp 91-100. *In: Temas Selectos en Fitosanidad y Producción de Hortalizas.* BAUTISTA M., N.; SÁNCHEZ VARGAS, A. D.; MORALES GALVÁN, O. (eds.). Instituto de Fitosanidad. México. Colegio de Postgraduados. Montecillo, México.
- GEORGHIOU G. P.; TAYLOR, C. E. 1977. Genetic and biological influence in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- GONZÁLEZ C., J.; HERRERO, S.; SAYYED, A. H.; SCRICHE, B.; LIU, B.; MEYER, S. K.; WRIGHT, D. J.; TABASHNIK, B. E.; FERRE, J. 2001. Variation in susceptibility to *Bacillus thuringiensis* toxins among unselected strains of *Plutella xylostella*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4610-4613.
- MCGAUGHEY, W. H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis* in indianmeal moth (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 80: 1122-1126.
- SHELTON, A. M.; ROBERTSON, J. L.; TANG, J. D.; PÉREZ, C.; EINGENBORE, S. D.; PREISLER, W. K.; WILSEY, W. T.; COOLEY B. J. 1993. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. *J. Econ. Entomol.* 86: 697-705.
- TABASHNIK, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- TABASHNIK, B. E.; CUSHING, N. L.; FINSON, N.; JOHNSON, M. W. 1990. Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 83: 1671-1676.