

Producción de brócoli libre de insecticidas químicos mediante el uso de la bacteria *Bacillus thuringiensis*

V. Braca-Arellano¹, C.J. González-Gutiérrez¹, F. Tamayo-Mejía², y M.C. Del Rincón-Castro. *^{1,3}

1 Posgrado en Biociencias, División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca. **2** Secretaría de Desarrollo Agroalimentario y Rural, Celaya, Guanajuato. **3** Departamento de Alimentos División de Ciencias de la Vida, Universidad de Guanajuato Campus Irapuato-Salamanca.

*cdelrincon@ugto.mx

RESUMEN

Uno de los insectos-plaga que ataca al cultivo de brócoli en el Bajío de Guanajuato, es la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella*, la cual se considera de difícil manejo, y tiene efectos indirectos al contaminar el producto comercial que se cosecha. Esta plaga se controla casi de manera exclusiva con insecticidas químicos, pero existen alternativas a ellos como son los agentes de control biológico. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria del suelo que forma esporas aeróbicas o facultativas. Durante muchos años productos a base del complejo esporacristal de *Bt* se han utilizado para el control de lepidópteros. En este trabajo se caracterizó a nivel biológico mediante bioensayos, a aquellas cepas con mayor toxicidad hacia esta plaga y se evaluó a nivel de invernadero, aquellas más tóxicas. Las cepas LBIT-13 y LBIT-418 de *Bacillus thuringiensis* son letales para larvas de *Plutella xylostella*. El tinopal funciona como protector del complejo espora cristal de *Bacillus thuringiensis* contra los rayos de Luz UV. Hasta el momento los resultados muestran que la cepa LBIT-13 es la mejor para el control de larvas de *Plutella xylostella* a nivel de invernadero y poseen el mayor potencial como agente de control biológico contra esta plaga.

Palabras clave: brócoli, *Bacillus thuringiensis*, inocuidad alimentaria

ABSTRACT

One of the pest insects that attacks broccoli crops in the Bajío de Guanajuato is the diamondback moth *Plutella xylostella*, which is considered difficult to handle and has indirect effects by contaminating the harvested commercial product. This pest is controlled almost exclusively with chemical insecticides, but there are alternatives to them, such as biological control agents. *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) is a soil bacterium that forms aerobic or facultative spores. For many years products based on the *Bt* spore-crystal complex have been used for the control of Lepidopterans. In this work, those strains with greater toxicity towards this pest were characterized at the biological level utilizing bioassays, and those most toxic were evaluated at the greenhouse level. *Bacillus thuringiensis* strains LBIT-13, and LBIT-418 are lethal to *Plutella xylostella* larvae. The tinopal works as a protector of the crystal spore complex of *Bacillus thuringiensis* against UV light rays. So far, the results show that the LBIT-13 strain is the best for the control of *Plutella xylostella* larvae at the greenhouse level and has the greatest potential as a biological control agent against this pest.

Keywords: broccoli, *Bacillus thuringiensis*, food safety

Área: Microbiología y Biotecnología

INTRODUCCIÓN

Uno de los insectos-plaga que ataca al cultivo de brócoli en el Bajío de Guanajuato es la palomilla dorso de diamante la cual se considera de difícil manejo, ya que, aunque no afecta el rendimiento, tiene efectos indirectos al contaminar el producto comercial que se cosecha. En Guanajuato la plaga se registró desde la década de los setenta; siendo a mediados de la década de los ochenta cuando se convirtió en una seria amenaza para estos cultivos, lo que obligó a los productores a asperjar semanalmente mezclas múltiples para su control con resultados poco eficientes (Bujanos *et al.*, 2013). Aunque el control biológico de las plagas se ha perseguido activamente durante más de un siglo y la última década ha visto una aceleración de los esfuerzos de investigación para comprender mejor la biología y la ecología de los enemigos naturales, los insecticidas siguen siendo la base del manejo de plagas en muchos sistemas de cultivo (Gurr, 2018).

Bacillus thuringiensis (*Bt*) es una bacteria del suelo única que forma esporas aeróbicas o facultativas Gram positivas. Los estudios relacionados con *Bt* se centran principalmente en su actividad insecticida debido a sus propiedades entomopatógenas (Azizoglu, 2019). Durante muchos años productos a base del complejo spora-cristal de *Bt* se han utilizado para el control de lepidópteros, entre ellos a la palomilla dorso de diamante. En el desarrollo de formulaciones la elección de la cepa es un punto clave, continuamente se buscan nuevas cepas con nuevas actividades tóxicas o se buscan alternativas para incrementar la toxicidad de éstas (Rosas-García, 2008). Por lo tanto, es importante continuar con el estudio de cepas nativas de *Bt* con efecto bioinsecticida contra la palomilla dorso de diamante y llevar estas evaluaciones a campo, en este trabajo el objetivo es determinar la mejor formulación de *Bacillus thuringiensis* proveniente de 2 cepas nativas aisladas en el estado de Guanajuato para el control de *Plutella xylostella* a nivel de campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mantenimiento de la colonia de *Plutella xylostella*.

Para mantener la colonia se cuenta con incubadoras donde se mantiene a los adultos, en la parte de arriba se colocan 2 esponjas con miel de maple al 10% en agua destilada para su alimentación. Se colocaron hojas frescas de brócoli en recipientes con agua donde ovipositaron las hembras, las hojas con los huevecillos se colocaron en recipientes de plástico cubiertos con tela de organza para permitir la entrada de aire, los cuales fueron colocados en una mesa donde no hay humedad ni luz directa del sol; estos recipientes se revisaron diariamente para observar el crecimiento de las larvas, cambiar las hojas y mantener limpio el recipiente. Las larvas del 3er instar se colocaron en cajas Petri con dieta artificial, al pasar a pupas, estas se pasaron a cajas Petri para incubarse, para esperar posteriormente a que los adultos emerjan y continuar el ciclo. Las hojas de brócoli se colectaron de un pequeño invernadero que se tiene a lado del laboratorio, el cual es producido de manera orgánica y bajo micro túnel, para evitar la contaminación con otros insectos plaga, así se garantiza que las hojas utilizadas están libres de patógenos y de agroquímicos.

Amplificación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Las cepas LBIT-13, LBIT-418 y el control HD-1 se sembraron en placas petri con medio agar métodos estandar y de ahí se partió para hacer siembras en medio de leche peptonizada (1.0 % leche peptonizada, 0.7 % dextrosa, 0.2 % extracto de levadura, 0.01 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 % $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 % $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.002 % $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ y agua destilada estéril). La siembra se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio previamente esterilizado y ajustado a pH 7.5, se inocularon

asépticamente las cepas de estudio y la cepa control con un palillo estéril en la campana de flujo laminar. Se incubaron (Shaking Incubator de Shel Lab) a 28 °C, por 120 horas a 280 rpm para obtener las células lisadas.

Pruebas de invernadero.

El diseño utilizado fue completamente al azar con 3 repeticiones, los tratamientos fueron las 2 cepas de estudio y dos testigos uno con agua y otro con Dipel, teniendo como variable respuesta el número de larvas presentes en la planta. El análisis estadístico se realizó en el Statgraphic con un ANOVA. Los conteos se realizaron en 10 plantas tomadas al azar dentro de cada tratamiento, previo a la aplicación y 5 días posteriores a esta. El registro se realizó siguiendo la metodología propuesta por Bujanos *et al.* (2013), donde se analizarán 10 plantas ubicadas en cada unidad experimental desde las hojas basales hasta la parte de la inflorescencia de cada planta, registrando presencia de larvas y daños ocasionados por estas. Se utilizó un aspersor tipo mochila, con una boquilla de cono hueco para lograr que el producto llegue al envés de las hojas que es donde se sitúan las larvas. Para la calibración del equipo se realizaron varias pruebas asperjando un tramo de surco para observar la dirección del líquido a la planta, así como el abarcamiento completo del área foliar, y así definir la velocidad de aplicación. A los 5 días después de la aplicación se realizó el conteo de las larvas presentes en el cultivo para evaluar el nivel de control, así como presencia de daños ocasionados por estas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Amplificación de las cepas de *Bacillus thuringiensis*. El protocolo para la amplificación de *Bacillus thuringiensis* indicó que se debe dejar de 72 a 96 horas el medio inoculado en orbitación a 280 rpm; sin embargo, en las observaciones al microscopio para confirmar la lisis de las células (Fig. 1), se determinó que el momento adecuado para ambas cepas de estudio, fue a las 120 horas.

Una actividad importante cuando se siembra en medio de leche peptonizada es observar al microscopio si las células de cada

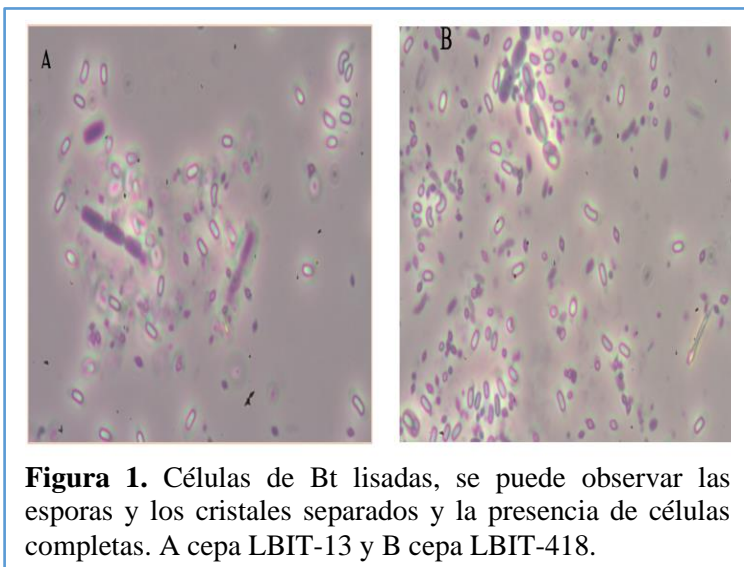


Figura 1. Células de Bt lisadas, se puede observar las esporas y los cristales separados y la presencia de células completas. A cepa LBIT-13 y B cepa LBIT-418.

cepa han lisado, esto para estar seguros que tendremos el complejo espora cristal al momento de liofilizar la pastilla resultante, por lo cual es importante conocer como se observa cada cepa. En la Figura 1 se puede observar presencia de esporas, cristales y algunas células completas, también se pudo observar que ambas cepas poseen cristales bipiramidales y la cepa LBIT-418 contiene también cristales en forma de cuadrado aplanado. Hasta el momento se cuenta con 188 miligramos de la cepa LBIT-13, 313 miligramos de la cepa LBIT-418 y 328 miligramos de la cepa control HD-1, los cuales se encuentran almacenados en tubos eppendorf a -20°C y serán utilizados para los bioensayos cualitativos y bioensayos finos para determinar la CL₅₀. El manejo de la colonia nos proporcionó alrededor de 3,200 larvas y 300 adultos por mes en el periodo primavera-verano. La obtención del complejo espora cristal se realizó en medio de leche peptonizada como lo reporta Vázquez-Ramírez (2015). Se realizaron los bioensayos burdos para comprobar que las cepas de estudio son letales para la palomilla, los resultados mostraron una mortalidad del 100%. En el caso de los bioensayos semifinos donde se probó 160 µg/ml también

mostraron una mortalidad del 100%. Los bioensayos con Tinopal como protector de luz ultravioleta mostraron que una concentración al 0.1% proporciona defensa a los cristales y no incrementa la actividad insecticida del formulado, situación ya reportada por Tamez- Guerra (2006). La CL_{50} de la cepa LBIT 13 se encuentra en 96.14 ng/cm^2 y la cepa LBIT 418 se encuentra en 79.71 ng/cm^2 ; sin embargo, estos resultados son diferentes a los reportados por Vázquez-Ramírez (2015) donde la cepa LBIT 13 se reporta con una CL_{50} más baja que la cepa LBIT 418 en bioensayos realizados en *Spodoptera frugiperda*.

Pruebas de invernadero. Las pruebas en plantas establecidas en invernadero se realizan con el objetivo de conocer el efecto de las cepas de *Bt* en plantas cuyo control de *Plutella xylostella* se realiza sólo con este bioinsecticida. Se realizó un ANOVA simple para evaluar el efecto del tratamiento sobre la presencia de larvas de *Plutella xylostella* en plantas de brócoli. Las pruebas con surfactante mostraron que su uso proporciona mejor adherencia y dispersión del formulado en la hoja, mejorando sus características físicas para una mejor distribución del producto, como lo reporta Dos Santos (2019). Los resultados de las pruebas en plantas de brócoli establecidas en invernadero muestran que hay diferencias significativas con un P-value de 0.044 y un nivel de confianza del 95%. En la Figura 2 se muestran las medias por tratamiento, donde podemos observar que el tratamiento 2 (LBIT-13) es donde se encontró el menor número de larvas presentes, seguido del tratamiento 4 (Dipel), le sigue el tratamiento 1 (Agua) y al final el tratamiento 3 (LBIT-418), los resultados exponen que el tratamiento con mejor control es donde se aplicó la cepa LBIT-13.

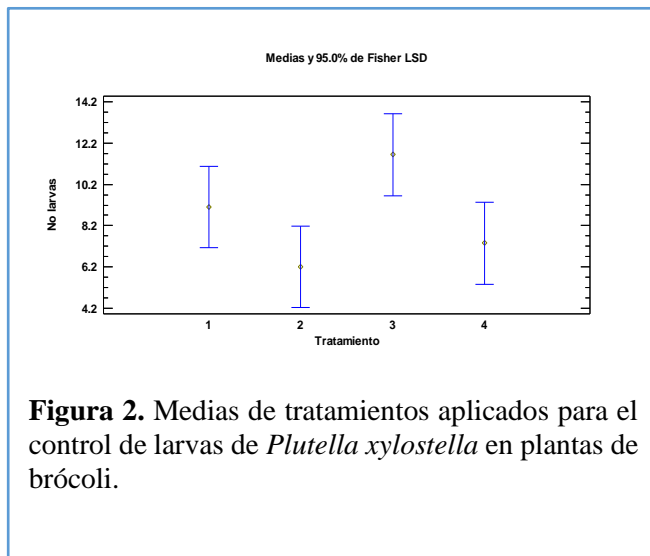


Figura 2. Medias de tratamientos aplicados para el control de larvas de *Plutella xylostella* en plantas de brócoli.

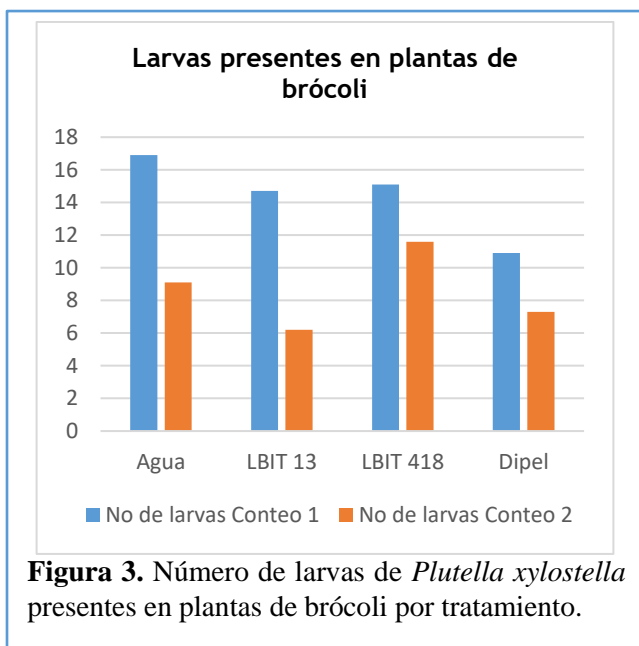


Figura 3. Número de larvas de *Plutella xylostella* presentes en plantas de brócoli por tratamiento.

En la Figura 3, se muestran el número de larvas presentes antes (Conteo 1) y después (Conteo 2) de la aplicación en cada tratamiento, podemos observar que el tratamiento con la cepa LBIT-13 es donde disminuyó más el número de larvas presentes, seguido del tratamiento con Dipel, le sigue el testigo negativo con agua y al final el tratamiento con la Cepa LBIT-418. Por todo se concluye que las cepas LBIT-13 y LBIT-418 de *Bacillus thuringiensis* son letales para larvas de *Plutella xylostella*. El Tinopal funciona como protector del complejo espora cristal de *Bacillus thuringiensis* contra los rayos de Luz UV. Hasta el momento los resultados muestran que la cepa LBIT-13 es la mejor para el control de larvas de *Plutella xylostella* a nivel de invernadero y poseen el mayor potencial como agente de control biológico contra esta plaga.

BIBLIOGRAFÍA

- Azizoglu, U. 2019. *Bacillus thuringiensis* as a Biofertilizer and Biostimulator: a Mini-Review of the Little-Known Plant Growth-Promoting Properties of Bt. *Current Microbiology*, 1-7.
- Bujanos Muñiz, R., Marín Jarillo, A., Díaz Espino, L. F., Gámez Vázquez, A. J., Ávila Perches, M. Á., Herrera Vega, R., & Gámez Vázquez, F. P. 2013. Manejo integrado de la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) en la región del bajío, México. Pp 40.
- Dos Santos, C. A. M., da Silva Santos, R. T., Della'Vechia, J. F., Griesang, F., Polanczyk, R. A., & da Costa Ferreira, M. 2019. Effect of addition of adjuvants on physical and chemical characteristics of Bt bioinsecticide mixture. *Scientific reports*, 9(1), 1-8.
- Gurr, G. M., Reynolds, O. L., Johnson, A. C., Desneux, N., Zalucki, M. P., Furlong, M. J., & You, M. 2018. Landscape ecology and expanding range of biocontrol agent taxa enhance prospects for diamondback moth management. A review. *Agronomy for sustainable development*, 38(3), 23.
- Rosas-García, N. M. 2008. Avances en el desarrollo de formulaciones insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(1), 49-63.
- Tamez Guerra, P., Zamudio, V., Martínez Carrillo, J. L., Rodríguez Padilla, C., Tamez Guerra, R. S., & Gómez Flores, R. A. (2006). Formulaciones granulares de baculovirus en combinación con abrillantadores ópticos para su empleo como bioinsecticida. *Ciencia UANL*, 9(2).
- Vázquez-Ramírez, M. F., Rangel-Núñez, J. C., Ibarra, J. E., & Del Rincón-Castro, M. C. 2015. Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 40(6), 397-402.