Rev. per. Ent. 44: 95-100. Noviembre 2004

Clones de papa transformados con la toxina de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) contra la polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller). II. Selección y evaluación de la expresión del gen crylA(b) en el desarrollo de la polilla

Delicia Verónica Cañedo [1] *Fausto Cisneros* [2]

RESUMEN

CAÑEDO *DV, CISNEROS F. 2004. Clones de papa transformados con la toxina de* Bacillus thuringiensis *(Berliner) contra la polilla de la papa,* Phthorimaea operculella *(Zeller). II. Selección y evaluación de la expresión del gen crylA(b) en el desarrollo de la polilla. Rev. per. Ent. 44.-* Los clones diploides de papa transformados con el gen Bt ciylA(b) fueron evaluados mediante bioensayos con follaje y tubérculos para determinar la toxicidad del gen contra la polilla de la papa. Treinta y ocho líneas del clon MI 4910, ocho de KW PTM29 y 42 del cv. Desirée mostraron altos niveles de resistencia (100 % de mortalidad larval) en pruebas con follaje, mientras 39, 8 y 33 líneas de MI 4910, KW PTM29 y el cv. Desirée, respectivamente, mostraron altos niveles de resistencia en pruebas con tubérculos. Las larvas que sobrevivieron a la alimentación con plantas transgénicas que no presentaron altos niveles de expresión del gen (20-64 % de mortalidad larval) mostraron una reducción de 40 % en su longitud y 22% en su peso al cabo de dos días. El tiempo de mortalidad de las larvas, estuvo entre 3 y 6 días, dependiendo de la temperatura.

Palabras clave: *Bacillus thuringiensis,* clones de papa, *Phthorimaea operculella,* polilla de la papa.

SUMMARY

CAÑEDO DV, CISNEROS F. 2004. Potato clones transformed with Bacillus thuringiensis *(Berliner) toxín against the potato tuber moth,* Phthorimaea operculella *(Zeller). 11. Selection and evaluation ofthe expression oflhe gene crylA(b) on the development of the moth. Rev. per. Ent. 44.-* Toxicity of Bt crylA(b) diploid transgenic plants against the potato tuber moth was evaluated with foliage and tuber samples. In foliage, 38 Unes of the MI clone 4910, eight of KW PTM29 and 42 of cv. Desirée showed the highest levéis of resistance (100 % of larval mortality). In evaluations with tubers, 39, 8 and 33 lines from MI 4910, KW PTM29 and cv. Desirée respectively showed the highest levéis of resistance (100 % of larval mortality). Larvae that survived feeding on transgenic plants with low expression levéis of Bt crylA(b) (20-64 % of larval mortality) showed a reducción of 40 % in their size and 22 % in their weight in two days. Larval mortality oceurred in 3-6 days, depending on temperature.

Key words: *Bacillus thuringiensis, Phthorimaea operculella,* potato clones, potato tuber moth.

Introducción

La polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller) es una de las principales plagas de papa en climas tropicales y subtropicales (FENEMORE 1988). Las larvas minan el follaje y barrenan los tallos y tubérculos. Este daño causa serias pérdidas económicas, especialmente en almacenes tradicionales no refrigerados. Los agricultores aplican insecticidas al inicio del almacenamiento para el control de la polilla (Roux *et al.* 1992). En India, las pérdidas reportadas en almacenamiento van de 30 a 70 % (SAXEMA & RIZVI 1974), mientras en América Latina pueden llegar a 80 % (RAMAN 1988). En el manejo integrado de esta plaga, uno de los principales componentes es el control cultural, que contempla el uso de plantas resistentes al ataque de insectos. El uso de las plantas transgénicas que expresan las ?-endotoxinas del *Bacillus thuringiensis* (Bt) ofrece la posibilidad de reducir los costos ambientales y de salud asociados con el uso de los insecticidas convencionales. La polilla de la papa, *Phthorimaea operculella* (Zeller) es susceptible a los cristales insecticidas del Bt. (JANSENS *et al.* 1995, CAÑEDO *et al.* 1999). Los objetivos de la presente investigación fueron 1) evaluar y seleccionar el material transformado que expresa el gen Bt crylA(b), confiriendo la resistencia a la polilla de la papa *Phthorimaea operculella;* y 2) evaluar la expresión del gen en el desarrollo larval de *P. operculella.*

Material y métodos

El presente trabajo se llevó a cabo en los laboratorios de entomología e invernaderos del Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Pe-

1 Escuela de Postgrado, Universidad Nacional Agraria La Molina, Apartado 456, Lima-100, Perú.
2 Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.

rú. Su desarrollo comprendió la evaluación de la expresión del gen Bt crylA(b) en las líneas transgénicas de dos clones diploides, determinando su resistencia a la polilla de la papa, y la evaluación del efecto del gen expresado en el desarrollo larval de la polilla.

Material

1. Líneas transgénicas de los clones diploides: ocho líneas de KW PTM29, 37 de MI 4910, y 42 de la variedad Desirée, con el gen crylA(b) del *B. thuringiensis.*

2. Poblaciones de polilla de la papa, que se mantienen en forma permanente en el insectario del CIP, con diversos fines.

Métodos

El valor de la expresión del gen Bt crylA(b) se mide como efecto sobre la plaga, para lo que fue necesario hacer los bioensayos correspondientes.

Pruebas en follaje: Se utilizó 10 plantas transgénicas por cada línea, que fueron infestadas con 25 larvas recién emergidas por planta (cada planta representa una repetición). La evaluación se realizó en los brotes, axilas y hojas, para encontrar las larvas vivas y muertas a los 3,10 y 20 d después de la infestación. Los datos fueron expresados en porcentaje de mortalidad. La prueba se llevó a cabo en condiciones no controladas de humedad y temperatura, durante 1996-1997. Los resultados fueron analizados mediante diseño completamente al azar, con 10 repeticiones, en el sistema SAS (1989).

Pruebas en tubérculos: Se utilizó el número de tubérculos que la cosecha de las plantas transgénicas permitió, que fueron infestados con larvas de polilla. El número de larvas dependió de la cantidad de tubérculos colocados, considerando que una larva de polilla necesita 5 g de papa para cumplir su desarrollo. Al cabo de 15-20 d (de acuerdo a la época de la prueba), se contó el número de pupas y adultos que desarrollaron, expresando los resultados en porcentaje de sobrevivencia, y por diferencia el porcentaje de mortalidad. Los resultados de la prueba se analizaron mediante el diseño completamente al azar, con tres repeticiones. La prueba se realizó bajo condiciones controladas de temperatura (26 ± I° C) y humedad relativa promedio de 70 %.

Análisis estadístico: Se hizo la transformación angular de los datos utilizando el arcoseno de la raíz cuadrada del porcentaje de mortalidad larval. Además, el 0 % fue reemplazado por l/4n (donde n es igual al número de repeticiones), y el 100 % fue reemplazado por (100 - l/4n) (BARLETT 1947). La prueba de significancia de medias se realizó mediante la de Dunnett, que compara los diferentes tratamientos con el testigo sin transformar (DUNNETT 1955). Se utilizó un nivel de 0,01 de probabilidad.

Efecto sobre el desarrollo larval: Con la finalidad de determinar el efecto del gen de *B. thuringiensis,* expresado en las líneas transgénicas, sobre el desarrollo de los diferentes estadios larvales de la polilla, se escogió tres líneas transgénicas del cv. Desirée y una del clon MI4910. Se escogió estos clones pues son susceptibles al ataque de la polilla, y se quería observar solo el efecto del gen de Bt en el desarrollo larval. Así, se cortó folíolos apicales de las líneas transgénicas en estudio y se les colocó un algodón embebido en agua en el peciolo, para que pudieran mantenerse turgentes. Luego fueron colocados en vasos de plástico de 0,5 1 y cambiados cada 2 d. La infestación se realizó con 10 larvas neonatas por vaso. Estos fueron tapados herméticamente con tapas de plástico, para evitar el escape de las larvas recién emergidas. La evaluación se realizó en forma diaria, registrando el número de larvas vivas y muertas, expresando estos resultados en porcentaje de mortalidad, y registrando el peso y tamaño de las larvas. Se pesó las pupas y se esperó la emergencia de los adultos. Los adultos fueron colocados en envases de 0,5 1, anotándose el número de posturas colocadas por hembra, así como el porcentaje de eclosión de los huevos. Para los análisis estadísticos de todas las pruebas se utilizó el sistema SAS (1989). Para el porcentaje de mortalidad, los datos fueron transformados, tal como se indicó en la prueba anterior.

Resultados y discusión

Pruebas en follaje (Tabla 1): Con respecto al clon MI4910, en la prueba con kanamicina se obtuvo 71 líneas transgénicas; sin embargo, se evaluó solo 53, debido a que la diferencia se perdió en el proceso de propagación, ya que no se pudo eliminar la bacteria *Agrobacterium tumefaciens.* De éstas, 38 mostraron 100 % de mortalidad (series 6 y 8) y 15 presentaron diferentes grados de mortalidad (fig. la). Las ocho líneas transformadas del clon KW PTM 29 presentaron una alta mortalidad larval (100 %), a diferencia de su testigo sin transformar, que presentó 64 % (fig. Ib). Este clon fue seleccionado por su cierto grado de resistencia al ataque de la polilla, lo que se refleja en el relativamente alto porcentaje de mortalidad del testigo, a diferencia del testigo sin transformar del clon MI 4910, que presentó 36 % de mortalidad. Con respecto al cv. Desirée, y de la misma manera que en el clon MI 4910, en la prueba con kanamicina se obtuvo 77 líneas transgénicas de las cuales fueron evaluadas 54. Cuarenta y dos líneas evaluadas (series 21 y 23), correspondien-

tes al 82 % del total, mostraron 100 % de mortalidad larval (fig. 1e). La diferencia presentó diversos grados de susceptibilidad (Tabla 1). El daño ocasionado por las larvas en las líneas transgénicas con alta expresión del gen fue bastante reducido, limitándose el ocasionado por la larva recién emergida a unas raspaduras, ya que ésta necesariamente tiene que comer para que la toxina sea ingerida y pueda actuar. La diferencia que existe entre los porcentajes de mortalidad en las diferentes líneas se debe principalmente a que el gen, estando presente en las plantas, produce cantidades variables de toxina, lo que en algunos casos no es suficiente para causar mortalidad en las larvas. Luego de 20 d, las larvas permanecieron vivas, lo que sugiere que el gen no se estaba expresando adecuadamente en el follaje.

Prueba en tubérculos. Ffue muy importante, ya que el daño ocasionado cobra mayor importancia a nivel de tubérculos, siendo muy difícil en el campo llegar a ellos con insecticidas; de no ejercerse ningún método de control, puede ocasionar el 100 % de daño a nivel de almacenamiento. Con respecto al clon MI4910, se evaluó 53 líneas y los resultados se presentaron en forma muy similar a la prueba de follaje (Tabla 1). Treinta y nueve líneas mostraron altos niveles de resistencia (100 % de mortalidad) (fig. 2a). Las demás líneas se dispusieron en tres grupos. Las ocho líneas evaluadas del clon KW PTM 29 mostraron mortalidad de 100 %, a diferencia del testigo, cuya mortalidad fue 0. Hasta la fecha, no se ha encontrado una correlación entre la resistencia expresada en follaje con aquella en tubérculos. Se ha podido observar que si bien este clon (KW PTM 29) tiene cierto grado de resistencia en follaje (64 % de mortalidad del testigo sin transformar), no lo presenta en tubérculos, motivo por el que el resultado del testigo en esta prueba fue 0 % de mortalidad (fig. 2b). Con respecto al cv. Desireée se evaluó 54 líneas. De ellas, 33 mostraron altos niveles de mortalidad (100 %) (fig. 3c). A diferencia de la prueba de follaje (donde 42 líneas tuvieron altos niveles de resistencia), las nueve líneas restantes mostraron niveles variables de resistencia, de 25-96,7 % de mortalidad. Esta variación puede deberse a la menor cantidad de toxina que se produce en algunas líneas transgénicas (en alguna parte de la

TABLA 1.- Resumen del efecto de las líneas transgénicas expresado en el porcentaje de mortalidad larval de la polilla de la papa en pruebas con follaje y tubérculos.

				Prueba en follaje				Prueba en tubérculos			
clon	bacteria	explante	cantidad	100 %	>75 %	75-50 %	<50 %	100 %	75-50 %	50-25 %	<25 %
MI 4910 (6)	3290	entrenudo	13	10	-	3	-	10	1	1	1
MI 4910 (8)	3370	entrenudo	40	28	1	7	4	29	1	4	6
KWPTM 29	3290	hoja	8	8	-	-	-	8	-	-	-
Desíreé (21)	3290	hoja	3	0	-	1	2	0	-	2	1
Desireé (23)	3370	hoja	51	42	3	4	2	33	6	6	6

FIGURA 1.- Efecto de larvas de *Phthorimaea operculella* en follaje no transgénico (izquierda) y transgénico (derecha) de los clones: a) MI4910, b) PTM 29 y c) Desirée. En el extremo superior izquierdo se muestra el daño inicial en las líneas transgénicas.

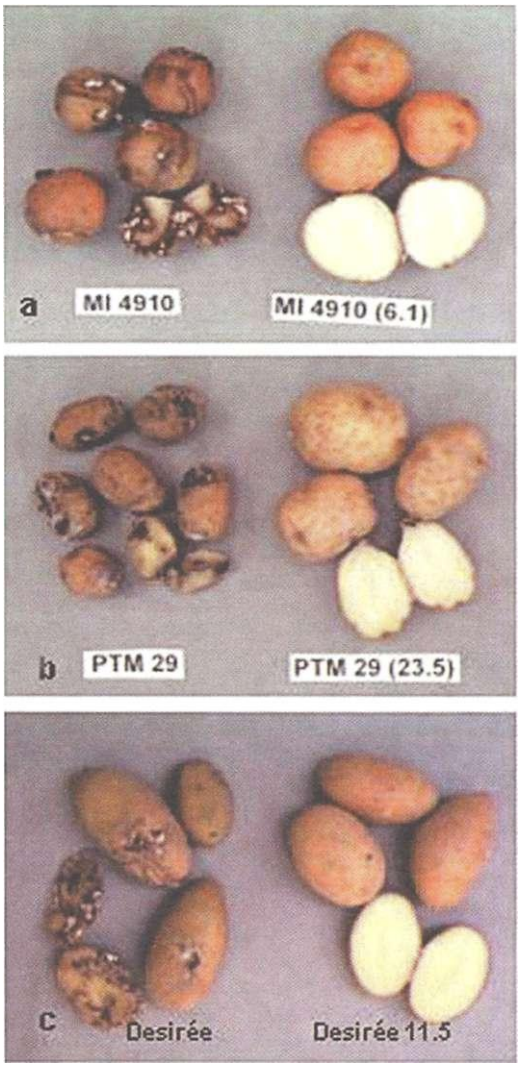

FIGURA 2.- Efecto de larvas de *Phthorimaea operculella* en tubérculos no transgénicos (izquierda) y transgénicos (derecha) de los clones: a) MI4910, b) PTM 29 *y* c) Desirée.

planta). La expresión del gen se manifiesta en toda la planta, sin embargo puede haber diferencias entre la cantidad de toxina producida tantc en follaje como en tubérculos.

Efecto sobre el desarrollo larval: La mortalidad larval se incrementó consistentemente en la línea Desirée 5.9 (D5.9), hasta alcanzar 100 % de mortalidad a los 11 d, resultado significativamente diferente a su testigo (Desirée sin trans formar), que presentó una mortalidad de 25 °*A* (p = 0,01). Esta prueba se llevó a cabo a uní temperatura de 19 °C + 2, lo que explica uní prolongación en el tiempo para que se produz ca la mortalidad larval en esta línea. Además, e dato de mortalidad se registró cuando la larv; murió, sin considerar que días antes estuve inactiva. En todos estos casos se pudo observa una prolongación de los estadios larvales coi relación al testigo. Al término de la prueba, ei el testigo se encontró pupas (75 %), a diferenci; de las líneas transgénicas que empuparon lúe go de tres días (50-60 %). Con relación a la Ion gitud de la larva, el clon D5.9 mostró una dife rencia significativa (p = 0,01) con relación a si testigo sin transformar, en todas las evaluado nes. Se observó, además, que el porcentaje d reducción de longitud al cabo de 2 d fue 40 % Este factor disminuyó hasta alcanzar 22 % d reducción al cabo de 11 d. Del mismo modo qu en el caso de la longitud, el peso de las larva en la línea D 5.9 fue significativamente meno al testigo (p = 0,01) en los primeros 5 d de eva luación (Tabla 3). Sin embargo, el porcentaje d reducción a los 11 d (a pesar de no ser estadíí ticamente diferente) fue 80 %. Esto demuestr que al actuar la toxina del Bt, la larva deja d alimentarse y como consecuencia hay una rt ducción en su crecimiento y desarrollo, y poste riormente muere. El efecto de la toxina del Bt s puede reflejar en la mortalidad de las larva; como también en reducción de su longitud peso, si las cantidades de toxina producida n

TABLA 2.- Porcentaje de mortalidad de larvas de *Phthorimaea operculella* criadas sobre follaje de plantas transgénicas de papa.

	mortalidad %	mortalidad %	Waller-Duncan	mortalidad %	Walter-Duncan	mortalidad %	Walter-Duncan	moralidad %	Walter-Duncan	mortalidad %	Walter Dunca
	1 día	4 días		6 días		7 días		8 días		11 días	
Desirée 10,2	11	13	Ab	20	B	27	b	31	b	51	B
Desirée 12,5	6	12	Ab	13	bc	19	bc	28	b	39	bc
Desirée 5,9	10	24	Ab	45	a	57	a	81	a	100	a
Desirée (control)	3	6	B	7	c	13	c	15	c	25	d
MI 4910-20	7	9	B	16	bc	19	bc	25	bc	36	cd
MI 4910 (control)	6	9	B	10	c	15	c	19	c	28	cd
C.V.	107,01	68,91		58,27		47,51		37,94		23,97	
D.S.	11,68	11,62		12,57		12,96		13,15		10,5	
Valor Waller-Duncan		11,34		10,71		11,01		10,7		8,43	

Promedios de la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes por la prueba de rangos mi tiples de Waller-Duncan (P = 0,01)

TABLA 3.- Determinación del peso y longitud de larvas de *Phhorimaea operculella* sobrevivientes a la alimentación sobre follaje de planas transgénicas de papa.

	peso (mg)	Dunnett	longitud (mm)	Dunneít	peso (mg)	Dunnett	longitud (mm)	Dunnett	pese (mg)	Dunnett	longitud (mm)	Dunnett	peso (mg)	Dunnett	longitud (mm)	Dunnett
	2 días				5 días				8 días				11 días			
Desirée 10,2	0,16 d		3,6? c		1,25 ab		5,2 a		2,26 a		6,95 a	***	3,92 be		737 ab	
Desirée 12,5	0,22 c		4,07 b	***	1,12 b		5,13 a		1,79 ab		6,21 ab		6,93 a		6,7 ¡ib	
Desirée 5,9	0,06 e		2,2 d	***	034 c		3,23 b	"*	1,12 c		4,75 c		0,35 c		5,25 b	
Desirée	0,27 b		3,67 c		1,01 b		5,11 a		1,33 be		5,83 b		4,31 be		6,76 ab	
MI 4910-20	0,25 be		3,83 c	***	1,49 a		5,21a		2,3 a		6,6 ab		5,32 ab		7,06 ob	
MI 4910	0,38 a		4,53 a		1,42 a		5,1 a		2,12 a		6,4 ab		5,49 ab		7,73 ab	
CV.	42,87		15,99		43,46		20,56		43,81		21,46		50,46		23,77	
D.S.	0,10		59,00		0,52		1,02		0,84		1,36		2,59		1,69	
Valor Dunnett	0,06		0,38		2,54		2,55		2,56		2,56		2,56		2^6	
Valor Waller Duncan	0,05		0,26		0,28		0,53		0,61		0,93		2,36		1,94	

Promedios de la misma columna seguidos por la misma letra no son significativamente diferentes por la prueba de rangos múltiples de Waller-Duncan (P = 0,01)

son suficientes para provocarles la muerte (EBORA *et al.* 1994). Pero esta reducción en la longitud y peso de las larvas se ve afectada por la cantidad de toxina ingerida. Así, las líneas Desirée 10.2 y 12.5 (D10.2 y D12.5) (Tabla 2) presentaron un menor porcentaje de mortalidad en comparación con la D5.9, pese a lo cual llegó a ser diferente estadísticamente a los 11 d después de infestada. Sin embargo, con relación a la longitud y peso de las larvas en estas líneas (DI0.2 y D12.5), no se observó diferencia estadística. (Tabla 3), lo que indica que la expresión del gen fue bastante reducida para tener efecto en la mortalidad y en aquéllas que permanecieron vivas en su desarrollo larval. En la línea MI 4910-20 no se apreció ningún efecto sobre el desarrollo larval (mortalidad, longitud y peso), lo que significa que en este caso el gen de Bt no se expresó, a pesar de estar presente en la planta, por lo tanto no hubo producción de toxina. Aquellas larvas que terminaron su desarrollo fueron recuperadas, y se esperó que emergieran los adultos para que ovipositen. En aquellas líneas donde se recuperó pupas, la expresión del gen fue muy escasa. Se observó la cantidad de posturas por hembra desarrolladas en las líneas transgénicas pero, luego de realizar los análisis de LSD y Dunnett, los tratamientos no fueron significativamente diferentes del testigo no transgénico. Ello indica que en los individuos que se desarrollaron en líneas transgénicas que no expresaron el gen del Bt, su capacidad de oviposición no se vio afectada, y se comportaron igual que en los testigos sin transformar.

Conclusiones

Treinta ocho de las 53 líneas evaluadas del clon MI 4910 mostraron 100 % de mortalidad larval en la prueba en follaje; lo mismo sucedió con las ocho líneas del clon KW PTM29 y 42 de las 54 líneas evaluadas del cv. Desirée. Todas presentan una alta expresión del gen crylA(b) en follaje. En las pruebas de tubérculos, 39 de las 53 líneas evaluadas del clon MI 4910 presentaron altos niveles de mortalidad larval (100 %). También las ocho líneas del clon KW PTM 29, y 33 de las 54 evaluadas de cv. Desirée mostraron 100 % de mortalidad larval. En las plantas con niveles bajos de expresión del gen, las larvas mostraron reducción de 40 % en la longitud y 22 % en peso al cabo de 2 d de alimentación y en aquellas líneas que no hubo expresión, no se observó ninguna diferencia en peso y longitud de las larvas. Las líneas transgénicas con muy reducida cantidad de toxina no afectan la capacidad de oviposición de la polilla de la papa. La efectividad de las plantas transgénicas con Bt contra la polilla de la papa, demostrada en este trabajo, hace de esta técnica una buena opción como componente del manejo integrado de plagas.

Agradecimientos: Al Dr. Aziz Lagnaoui por su apoyo en la culminación de la redacción final y al Sr. Francisco Ochoa por su constante apoyo en la ejecución del trabajo.

Literatura

Barlett MS. 1947. The use of transformations. Biometry 3: 39-52.

Cañedo V, Benavides J, Golmirzaie A, Cisneros F, Ghislain M, Lagnaoui A. 1999. Assessing Bt-transformed potatoes for potato tuber moth, *Phthorimaea operculella* (Zeller), management, pp. 161-170. In: Impact on a changing world. Program Report 1997-98. Lima, International Potato Center.

Dunnett CW. 1955. A múltiple comparisons procedure for comparing several treatments with

a control. J. amer. Statist. Assoc. 50: 1096-1121.

Ebora RV; Ebora MM, Sticklen MB. 1994. Transgenic potato expressing the *Bacillus thuringiensis* cryIA(c) gene effects on the survival and food consumption of *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) and *Ostrínia nubilalís* (Lepidoptera: Noctuidae). J. econ. Entom. 87(4): 1122-1127.

Fenemore PG. 1988. Host-plant location and selección by adult potato moth, *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera:Gelechiidae): a review. J. Ins. Physiol.34: 175-177.

Jansens S, Cornelissen M, De Clerco R, Reynaerts A, Peferoen M. 1995. *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae) resistance in potato by expression of the *Bacillus thuringiensis* CryIA(b) insecticidal crystalprotein. J. econ. Entom. 88(5): 1469-1476.

Raman KV. 1988. Integrated insect pest management for pota toes in developing countries. Circ. int. Potato Center 16(1): 1-8.

Roux O, Arx R, Baumgartaer J. 1992. Estimating potato tuberworm (Lepidoptera:Gelechiidae) damage in stored pota toes in Tunisia. J. econ. Entom. 85: 2246-2250.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniars T. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Ed. 2.

SAS Institute. 1989. SAS/STAT user's guide, versión 6. Cary, SAS Institute. Vol. 2. Ed. 4.

Saxema AP, Rizvi SMA. 1974. Insect pest problems of potato in India. J. indian Potato Assoc. 1: 45-30.