

DETECCION DE MATERIALES DEL GENERO *Persea* spp TOLERANTES A *Phytophthora cinnamomi* MEDIANTE CONDUCTIVIDAD ELECTRICA.

DETACHED OF MATERIALS OF THE *Persea* spp. GENUS TOLERANTS TO *Phytophthora cinnamomi* BY ELECTRICAL CONDUCTIVITY

Martha L. Salgado Siclán¹ y Leopoldo Fucikovsky Zak²

RESUMEN

La medición de la conductividad eléctrica de células infectadas puede emplearse en el diagnóstico fitosanitario para determinar la sensibilidad del hospedante al patógeno. En este estudio se contemplaron cuatro materiales del género *Persea*. Raíces de 15 mm de largo se inocularon con micelio de *Phytophthora cinnamomi* en tubos de ensaye con agua tridestilada, se incubaron a temperatura ambiente y se midió su conductividad eléctrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$) a las 24, 48, 72 y 120 horas. Se evaluó el efecto que tiene el hongo en dos diámetros de raíz, cuatro genotipos diferentes y la sintomatología de la enfermedad en el campo, con la liberación de microelectrolitos al medio. Los resultados indicaron que los cuatro materiales mostraron diferente conductividad eléctrica cuando se encontró presente el hongo en el medio de incubación. La conductividad eléctrica es mayor en todas las raíces tratadas con *P. cinnamomi*. El diámetro mayor de raíz (1.2 mm) en los diferentes materiales de *Persea* dejaron más clara la diferencia de conductividad con sus respectivos testigos. El daño aparente de los árboles establecidos en campo mostró una relación directa con el incremento de la conductividad eléctrica.

Palabras claves: Conductividad eléctrica, *Phytophthora cinnamomi*, *Persea* spp.

ABSTRACT

The measurement of electrical conductivity of infected cells can be employed in plant health diagnose in order to determine the sensibility of the host to the pathogen. In this study four materials of the genus *Persea* were used. Roots of 15 mm of length were inoculated with the mycelium of *Phytophthora cinnamomi* in test tubes with triply distilled water. These were incubated at room temperature and its electrical conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$) was measured at 24, 48, 72 and 120 hours. The effect of the fungus was evaluated with respect to two root diameters, four different genotypes and the symptomatology of the avocado root in field with the liberation of microelectrolytes in medium. Results indicated that the four materials showed different electrical conductivity when fungus was present in the incubation medium. The electrical conductivity is the highest in all the roots treated with *P. cinnamomi*. The biggest root diameter (1.2 mm) in the different *Persea* materials left more clearly the difference in conductivity compared with its respective controls. The apparent damage in well rooted field trees showed a direct relation with the increment of electric conductivity.

Key words: Electrical conductivity, *Phytophthora cinnamomi*, *Persea* spp.

¹ Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Ignacio Zaragoza No. 6, C.P. 51700, Coatepec Harinas, Estado de México.

² Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados, Carr. México-Texcoco, Km. 36.5 C.P. 56230

INTRODUCCION

La pudrición radical en árboles de aguacate causada por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* es un problema severo en regiones con suelos de excesiva humedad, compactos y de deficiente drenaje, que reducen el vigor de los árboles y con ello el declinamiento de la producción (Zentmyer, 1985).

La tristeza del aguacate, es la principal enfermedad que limita la producción de éste cultivo en México (Teliz, 1992). El hongo produce una pudrición radical oscura, en la parte aérea causa flacidez y amarillamiento en follaje, caída de hojas, disminución en la producción que finalmente conllevan a la muerte del árbol.

Los estudio de resistencia a *P. cinnamomi*, fueron iniciados por el Dr. G.A. Zentmyer en el año de 1952 (Zentmyer,1952). Estas colectas realizadas en 18 países que incluyen a 15 especies del genero *Persea* y otras especies pertenecientes a la familia Lauraceae. Grandes esfuerzos se han continuado haciendo en la búsqueda de patrones resistentes a la tristeza. Las colectas de materiales de aguacate realizadas en América Latina de la raza Mexicana y *P. schiedeana* han mostrado mayor resistencia *P. cinnamomi* (Zentmyer y Schieber, 1987) .

La resistencia de los materiales a *P. cinnamomi* se ha establecido en plantas crecidas en soluciones nutritivas inoculadas con el hongo (Zentmyer y Mircetich, 1965), en plántulas cultivadas en macetas y camas de siembra con suelo infestado (Zentmyer,1952), en árboles desarrollados en suelo naturalmente infestados (Van der Merwe, 1990) y mediante la liberación de microelectrolitos de raíces y hojas inoculadas (Zilberstein y Pinkas, 1987).

La búsqueda de material resistente a pudriciones para promover su uso como portainjertos en el control integrado de enfermedades de origen radical como *P. cinnamomi* es determinante en el desarrollo de este cultivo, por lo que éste trabajo pretendió evaluar la resistencia de algunos materiales establecidos en un banco de germoplasma del género *Persea* mediante la técnica de conductividad eléctrica .

ANTECEDENTES

Resistencia a *P. cinnamomi*

Las exploraciones realizadas en América Latina del género *Persea* y afines, han dado a conocer algunos materiales con resistencia a la tristeza. El programa de colecta de la Universidad de California, Riverside desde 1971 cuenta con una colección de 1 800 árboles provenientes de Centro América, Caribe y Sudamérica. Dentro del género *Persea* el subgénero *Eriodaphne* con fruto pequeño ha mostrado resistencia a *P. cinnamomi* mientras que el subgénero *Persea* que posee fruta larga se considera susceptible.

La variedad Duke procedente de la raza Mexicana, se ha establecido como resistente a *P. cinnamomi*; de éste, los segregantes Duke 6 y Duke 7 en especial este último, posee una alta resistencia al hongo, por lo que su propagación se hace clonalmente para uso como portainjerto desde hace diez años (Zentmyer y Schieber, 1987). Por otro lado el material G6 de raza Mexicana, colectado en 1971 en Guatemala ha mostrado resistencia a *P. cinnamomi*.

Los materiales *P. americana* var. guatemalensis, conocido como “aguacate de mico”, colectado en Guatemala y Nicaragua en los 50’s, *P. steyermarkii*, y *P. schiedeana* también han mostrado alta tolerancia a la tristeza.

Por otro lado el G755, un híbrido entre *P. americana* var. guatemalensis y *P. schiedeana* se ha promovido como portainjerto por su aspecto vigoroso y resistente al hongo (Zentmyer y Schieber, 1987).

Técnicas para evaluar resistencia

Los métodos para evaluar patrones resistentes a *Phytophthora* se iniciaron desde los 50’s con los trabajos desarrollados por Zentmyer y colaboradores con materiales colectados en distintas regiones de México, Guatemala, Honduras, el Salvador y Costa Rica (Zentmyer y Schieber, 1987).

La resistencia a *P. cinnamomi* de estas colecciones se han establecido bajo distintas técnicas como el uso de materiales en solución nutritiva, macetas y camas germinadoras con suelo infestado, callos de tejido inoculados y en plantaciones naturalmente infestadas en campo.

Zentmyer y Mircetich (1965) determinaron la resistencia de distintos materiales inoculando el hongo a una solución nutritiva, evaluando el número de infecciones en el sistema radical, dando la posibilidad de evaluar más de 20 000 plántulas de una forma sencilla.

Dolan y Coffey (1986) probaron la resistencia a *P. cinnamomi* en cuatro materiales establecidos en un banco de germoplasma, evaluando la susceptibilidad mediante el tamaño de lesión, severidad y porcentaje de reaslamiento del hongo. La selección de materiales producidos por clonación es una técnica que recomiendan en la evaluación de resistencia a *P. cinnamomi*, ya que de una manera rápida y sencilla se pueden seleccionar una gran cantidad de materiales.

Zilberstein y Pinkas (1987) evaluaron la resistencia de algunos materiales de aguacate con la pérdida de microelectrolitos de las raíces, producto de la infección del hongo.

Botha *et al.*, (1988) practicaron la inoculación de zoosporas en raíces y hojas de distintos materiales, midiendo colonización lineal, conductividad eléctrica y enquistamiento de zoosporas.

Van der Merwe *et al.*, (1992) probaron la resistencia de las raíces de materiales segregantes establecidos en campo en suelo naturalmente infestado, además demostraron, que las inoculaciones con micelio del hongo son tan efectivas como las efectuadas con zoosporas.

Ruiz *et al.*, (1992) realizaron pruebas de resistencia a *P. cinnamomi* en callos de aguacate en la selecciones Duke 7 y Semil 34, en los que se evaluó desarrollo hifal sobre los callos y pérdida de microelectrolitos. Entre ellos el Duke 7 mostró menor pérdida de microelectrolitos, lo que fue asociado con su resistencia al hongo.

Zilberstein *et al.*, (1995) en un banco de germoplasma, estudiaron el comportamiento de 15 portainjertos resistentes a la pudrición, salinidad y con alta productividad, desarrollados en una plantacion con suelo naturalmente infestado.

Permeabilidad de membrana y conductividad eléctrica

La técnica de la conductividad eléctrica (CE) está basada en el principio de los cambios de la permeabilidad en la membrana celular. La liberación de microelectrolitos al medio de incubación donde se encuentran, es producto de los cambio de permeabilidad de células dañadas de un tejido por causa de una infección (Wheeler, 1976). Aparentemente, existe una correlación entre un tejido susceptible y la liberación de electrolitos, atribuido al efecto estimulativo de la germinación o desarrollo del patógeno. Se sabe que en tejidos susceptibles la conductividad eléctrica en el medio de incubación aumenta inmediatamente después de inocular al hongo en raíces y hojas (Wheeler, 1976; Zilberstein y Pinkas, 1987).

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionaron los materiales de aguacate Colín V-33, Martín Grande, Criollo Raza Mexicana y *P. indica* establecidos en un banco de germoplasma de la Fundación Salvador Sánchez Colín- CICTAMEX, a los cuales se les aplicó hojarasca y aserrín en la zona de goteo para inducir la producción de raíces alimenticias. Dos meses después se colectaron cuidadosamente las raíces blancas y jóvenes que brotaban debajo de la hojarasca.

En el laboratorio, se seleccionaron aquellas raíces con diámetros de 0.9-1.2 mm, las cuales se cortaron en trozos de 15 mm de largo. Cinco trozos de cada uno de los diámetros de cada material se suspendieron en 10 ml de agua tridestilada, posteriormente se introdujo micelio de *P. cinnamomi*, incubándose en la oscuridad, según el experimento. A diferentes intervalos (24,48,72 y 120 horas) la pérdida de electrolitos se midió con la ayuda de un conductómetro Consort K610 que mediante un electrodo se sumergió en cada tubo que contenía las raíces, arrojando una lectura de microsiemens ($\mu\text{S}/\text{cm}^2$) de la solución incubadora.

Se realizaron tres experimentos, en el primero se evaluó el efecto del diámetro de las raíces inoculadas con el hongo y la liberación de electrolitos; en el segundo experimento, la susceptibilidad de cada genotipo a las infecciones provocadas por *P. cinnamomi* y en el tercero, la relación existente entre la sintomatología de árboles establecidos en suelo naturalmente infestado por el hongo y su conductividad eléctrica. En todos los experimentos se usó agua tridestilada; el análisis estadístico consistió en el cálculo de las medias de tres repeticiones de cada tratamiento del respectivo experimento.

Efecto del diámetro de raíz y CE

En el primer experimento se comparó el efecto de dos diámetros de raíz inoculados con el hongo en cuatro materiales de *Persea*. El micelio del patógeno se introdujo en los tubos que contenían las raíces de 0.9 ó 1.2 mm de diámetro, formando tres repeticiones por cada diámetro de raíz de cada genotipo utilizado.

Cada material vegetal se trató con y sin hongo, siendo éste último su respectivo testigo. La conductividad eléctrica se evaluó a distintos tiempos introduciendo el electrodo en el medio de incubación y enjuagando el mismo con agua para introducirlo de nueva cuenta en el siguiente tubo de ensaye.

Efecto del genotipo y la CE

En este experimento, se evaluó la conductividad eléctrica en los mismos cuatro materiales, inoculando micelio del hongo sobre raíces de diámetro grueso (1.2 mm). La incubación de raíces y toma de lectura se hizo al igual que el experimento anterior. El testigo de cada material consistió en la incubación de las raíces en agua sin el hongo.

Efecto de la sintomatología y la CE

Se evaluó la conductividad eléctrica de raíces procedentes de algunas selecciones establecidas en un segundo banco de germoplasma en el que predominan colectas de la Raza Guatemalteca, crecidos en suelo naturalmente infestado por el hongo. Se eligieron tres árboles aparentemente sanos y tres con distinto grado de daño. Los árboles con síntomas de tristeza se clasificaron en E1= con daños ligeros; E2= daños moderados con marchitez de ramas y flacidez de hojas y E3= daño severo, árbol casi muerto. Con respecto a los materiales sin síntomas de daño se clasificaron en S1= completamente sano y vigoroso; S2= sano y S3= ligeramente sano. Las raíces del S1 procedieron de una planta completamente sana crecida fuera de la zona de infestación natural. La extracción de raíces, lavados, incubación y lecturas se hicieron semejante a los experimentos arriba mencionados.

RESULTADOS Y DISCUSION

Efecto del diámetro de raíz y CE

Las inoculaciones de *P. cinnamomi* en las raíces de los materiales clonados: Colín V-33, *P. indica*, Criollo Raza Mexicana y Martín Grande en los 2 diámetros de raíz (0.9 y 1.2 mm) mostraron mayor concentración de microelectrolitos en el medio de incubación a las 120 horas (Fig. 1 a,b,c,d), que sus respectivos testigos.

La presencia del hongo en el medio de incubación, de alguna manera influyó en la liberación de microelectrolitos de cada material utilizado, en especial en las raíces gruesas inoculadas (Martín Grande = 96.5, *P. indica* = 255.9, Criollo Raza Mexicana = 99.6 y Colín V-33 = 44.7 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$). Al respecto, Zilberstein y Pinkas (1987) encontraron que la liberación de microelectrolitos está relacionada con el diámetro de raíz y su peso más que el tamaño de raíz.

Como se observó en *P. indica*, la pérdida de microelectrolitos fue alta mientras que materiales considerados como resistentes no manifestaron CE alta como el genotipo Martín Grande, según Zilberstein y Pinkas (1987) los materiales conocidos como susceptibles presentan mayor liberación de microelectrolitos que los materiales conocidos como resistentes.

Las inoculaciones mediante el empleo de micelio de *P. cinnamomi* dejaron ver la patogenicidad del hongo en todas las raíces de los materiales de aguacate. Al respecto Van der Merwe *et al.*, (1990) mencionan, que las inoculaciones con micelio pueden ser tan efectivas en el desarrollo de infecciones que las causadas por zoosporas de *P. cinnamomi*.

Efecto del genotipo y la CE

Las inoculaciones de micelio de *P. cinnamomi* en el medio de incubación en los distintos materiales de aguacate mostraron mayor conductividad eléctrica a las 120 horas que cuando no existió la presencia del hongo en el medio de incubación, siendo siempre diferente la conductividad eléctrica entre los materiales empleados.

Así, *P. indica* mostró mayor liberación de microelectrolitos 556.6, le siguió Colín V-33 con 309.6, Criollo Raza Mexicana 212.1 y Martín Grande 96.6 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$. Mientas que sus testigos respectivos (sin hongos), fueron 417, 248, 101.5 y 61.4 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$. El doble testigo que consistió en medir la conductividad eléctrica del medio de incubación con micelio del hongo fue de 10.7 $\mu\text{S}/\text{cm}^2$ (Fig. 2).

Existió una respuesta diferencial de cada uno de los genotipos a la presencia del hongo, observando que materiales conocidos como susceptibles presentaron mayor liberación de microelectrolitos que los reconocidos con cierta tolerancia. Considerando a *P. indica* como un material susceptible y Martín Grande como resistente, podemos

decir que bajo ésta técnica, los materiales como Colín V-33 y Criollo Raza Mexicana mostraron cierta tolerancia a la invasión del hongo. El reconocimiento entre materiales resistentes y susceptibles mediante conductividad eléctrica depende del nivel de resistencia deseado, reconociendo aquéllos como resistentes cuando la conductividad es baja (Zilberstein y Pinkas, 1987).

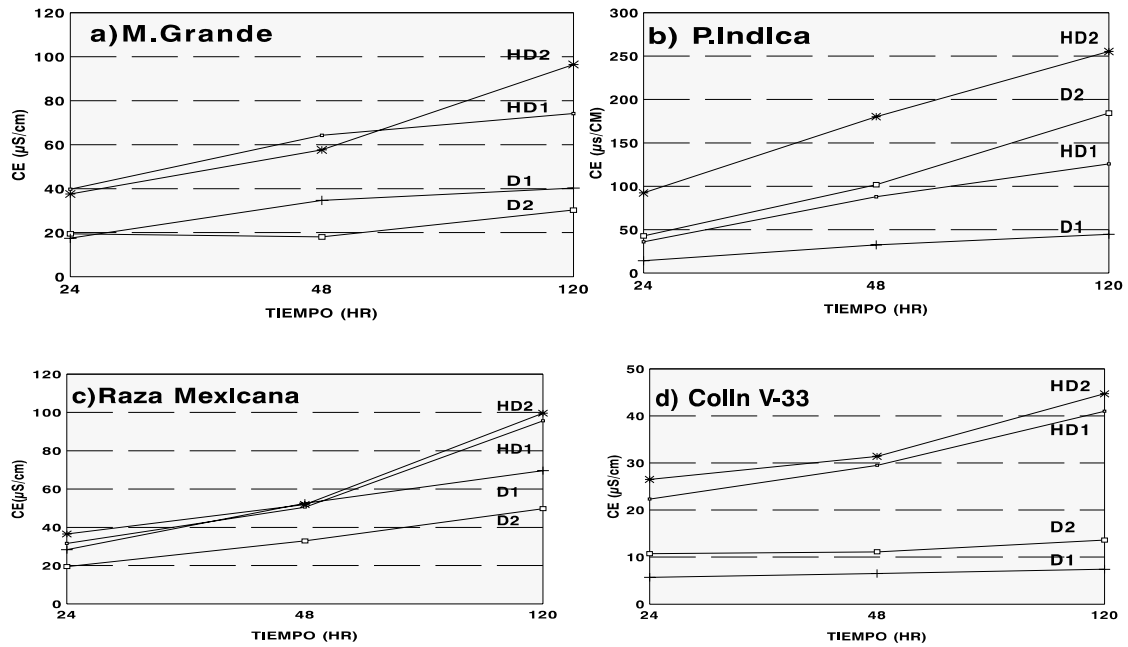
Con respecto a la razón en la liberación de microelectrolitos al medio de incubación (con hongo/sin hongo) de cada genotipo, ésta siempre fue mayor a uno en todos los materiales (*P. indica* =1.3, Colín V-33= 1.2, Criollo Raza Méx. = 2.0 Martín Grande = 1.5). Al respecto, la razón (con hongo/sin hongo) nos da una idea del efecto que tiene el hongo en cada genotipo. No así la comparación entre materiales donde cada material posee características fisiológicas y bioquímicas distintas, que pueden tener algún efecto en la conductividad eléctrica.

Efecto de la sintomatología y la CE

La apariencia de los árboles establecidos en suelo naturalmente infestado por *P. cinnamomi* mostró una relación directa con la conductividad eléctrica. Conforme transcurrió el tiempo de incubación de las raíces, mayor fue la conductividad eléctrica registrada en todos los materiales observados (Fig. 3).

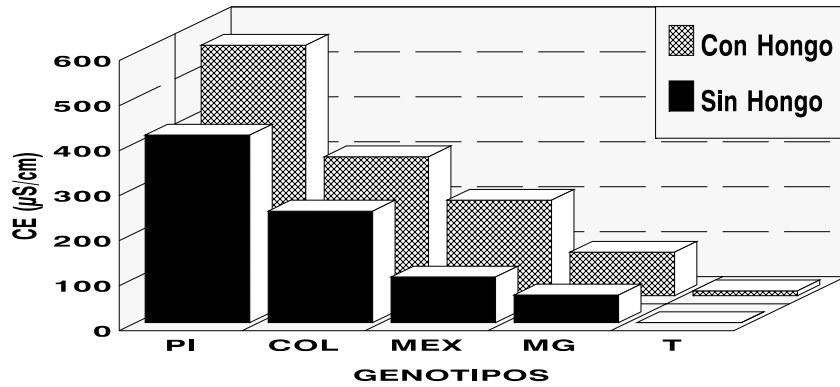
En general, se puede mencionar que raíces de materiales provenientes de árboles susceptibles a *P. cinnamomi* con síntoma visibles, la conductividad fue mayor, que en aquéllos aparentemente sanos.

El promedio de la conductividad eléctrica entre los materiales sanos (S1, S2 y S3) fue menor ($109.6 \mu\text{S}/\text{cm}^2$), que la de los árboles con síntomas visibles ($153.1 \mu\text{S}/\text{cm}^2$) sin embargo, la conductividad eléctrica entre materiales de estos dos grupos no mostraron diferencias de conductividad. Por lo que el grado de severidad en la parte aérea de los árboles con síntomas no mostraron relación con la conductividad eléctrica medida en sus raíces.



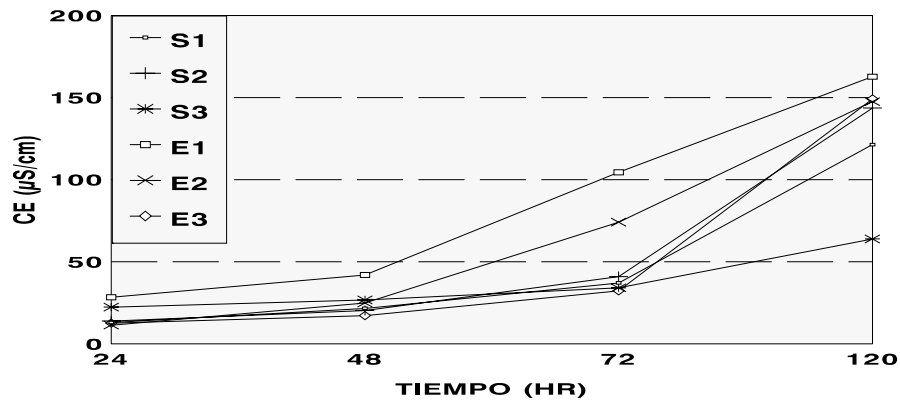
HD1= *P.cinnamomi* en diámetro de raíz delgado. D1= Sin hongo diámetro de raíz delgado. HD2= *P.cinnamomi* en diámetro de raíz grueso. D2= Sin hongo diámetro de raíz grueso.

Fig.1 Conductividad eléctrica (CE) de las soluciones incubadoras en dos diámetros de raíz de distintos genotipos de aguacate.



PI=P.indica; COL=Colin V-33; Mex= Segregante raza mexicana; MG=Martin Grande; T=testigo.

Fig.2 Conductividad eléctrica (CE) de las soluciones incubadoras de raíces de distintos genotipos de aguacate Inoculadas con P.cinnamomi a las 120h.



S1=Completamente sano; S2=Sano; S3=Ligeramente sano. E1=Con daños ligeros; E2= Daños moderados; E3=Daños severos.

Fig.3 Conductividad electrica de las soluciones incubadoras de raíces procedentes de árboles infectados por P.cinnamomi en condiciones de campo.

LITERATURA CITADA

- Botha T., F.C. Wehner and J. Kotzé., M. 1988. An evaluation of *in vitro* screening techniques for determining tolerance of avocado rootstocks to ***Phytophthora cinnamomi***. S.Afr. Avocado Grower's Assoc. Yrbk. 11: 60-63.
- Dolan T.E. and M.D.Coffey. 1986. Laboratory screening techniques for assesing resistance of four avocado rootstocks to ***Phytophthora cinnamomi***. Plant Dis. 70: 115-118.
- Reeves R.J. 1975. Behavior of ***Phytophthora cinnamomi*** in diferent soil and water regimens. Soil Biochem. 7: 18-24.
- Ruiz-Rosado M., L.J. Liu., F. Ferwerda., A. Arocho. 1992. Assesments on the resistance of avocado rootstocks to ***Phytophthora cinnamomi*** in Puerto Rico. *In*: Proc. of Second World Avocado Congress. pp: 67-68.
- Teliz D., A. Mora., C. Velázquez., R. García., G. Mora., P. Rodríguez ., J. Ethchevers., S. Salazar and P. H. Tsao. 1992. Integrated Management of ***Phytophthora*** root rot of avocado in Atlixco, Puebla, Mex. Proc. of Second World Avocado Congress. pp: 79-87.
- Van der Merwe M., de V., E., M. Mass., C. and J. Kotzé., M. 1990. Evaluation of field trees for resistance to ***Phytophthora cinnamomi*** by means of tha detached root technique. S.Afr. Avocado Grower's Assoc.Yrbk. 13: 63-64.
- Wheeler B.H and P. Hanchey. 1968. Permeability phenomena in plant disease. Annu. Rev. Phytopathol. 6: 331-350.
- Zentmyer G.A. 1952. Collecting avocados in Central America for disease resistance test. Calif. Avocado Soc. Yrbk. 32: 107-111.
- Zentmyer G.A. 1985. Origin and distribution of ***Phytophthora cinnamomi***. Calif. Avocado Soc.Yrbk. 69: 89-93.
- Zentmyer A.G. and H.D. Ohr. 1978. Systemic soil fungicides for the control of ***Phytophthora*** root rot and stem canker of avocado. Phytopathology 12: 142.
- Zentmyer G.A. and E. Schieber. 1987. The search for resistance to ***Phytophthora*** root in Latin America. S. Afr. Avocado Grower's Assoc. Yrbk. 10: 109-110.
- Zentmyer G.A. and S.M.Mircetich. 1965. Testing for resistance of avocado to ***Phytophthora*** in nutrient solution. Phytopathology 55: 487- 489.
- Zilberstein M. and Y. Pinkas, 1987. Detached root inoculation. A new method to evaluate resistance to ***Phytophthora*** root in avocado trees.Phytopathology 6: 841-844.
- Zilberstein M., A. Ben-Ya'acov and Y. Sela. 1995. Selection of avocado rootstocks to root-rot in Israel up-date report. *In*: World Avocado Congress III.Program and book of abstracts. Tel Aviv, Israel.. pp: 51.

ESTUDIO DE LA UNION *in vitro* DE ALGUNAS PROTEINAS DE *Bacillus thuringiensis* A LAS MICROVELLOCIDADES DEL EPITELIO INTESTINAL MEDIO DEL BARRENADOR GRANDE DEL HUESO DEL AGUACATE (*Heilipus lauri*).

STUDY OF SOME *Bacillus thuringiensis in vitro* PROTEINS BINDING OF THE MICROVILLAR OF THE MIDGUT EPITHELIUM OF THE AVOCADO SEED BIG BORER (*Heilipus lauri*)

Eduardo Aranda¹, Alejandra Bravo², Martha L. Salgado³, Jorge Sanchez².

RESUMEN

Bacillus thuringiensis produce proteínas con capacidad insecticida altamente específicas, de las que un cierto número son tóxicas contra especies de coleópteros, como lo es *Heilipus lauri* que se alimenta de la semilla de los frutos del aguacate. En éste trabajo se analizó la unión *in vitro* de algunas proteínas producidas por *B. thuringiensis* al epitelio intestinal de *H. lauri*. Proteínas específicas contra coleópteros: **Cry3B, Cry3C, Cry3D y Cry3E**; contra lepidópteros **Cry1Aa** y una nueva proteína del tipo **Cry3** (IB31, nativa mexicana), fueron marcadas con biotina e incubadas durante una hora con tejido intestinal de *H. lauri*, o tratadas con anticuerpos monoclonales. Las proteínas marcadas fueron localizadas con estreptavidina y reveladas con diaminobencidina y peróxido de hidrógeno. Las proteínas **Cry1Aa** y **Cry3** (IB31) se unieron ligeramente a las microvellocidades del epitelio intestinal. Estas mismas, incubadas con anticuerpos monoclonales **antiCry1A** y **antiCry1E** respectivamente, fueron fácilmente visualizadas en el tejido intestinal de *H. lauri*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, delta-endotoxinas, *Heilipus lauri*.

ABSTRACT

Protein with a high insecticide capacity are produced by *Bacillus thuringiensis*, and some of them are toxic against coleopteran species like *H. lauri* wich feeds avocado seed in this work we analyzed the *in vitro* binds of some specific proteins against coleopteran **Cry3B, Cry3C, Cry3D and Cry3E**; against lepidopteran **Cry1Aa**, and a new protein of the **Cry3** type (IB31 México native), were identified with a mark using biotina and then incubated about one hour with *H. lauri* intestinal tissue or treated with monoclonals antibodies. The marked proteins were located by means of streptavidina and revealed with diaminobencidin and peroxidase. The proteins **Cry1Aa** and **Cry3** (IB31) were light binding to midgut epithelium of larva of *H. lauri*. The same incubated with monoclonals antibodies **anti-Cry1A** and **anti-Cry1E** respectively were easily noticed on the *H. lauri* to midgut tissue.

Key words: *Bacillus thuringiensis*, Delt-endotoxins, *Heilipus lauri*.

¹ Lab. De Control Biológico, Centro de Invest. Biotec. Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), Av. Univ. 1001, Col. Chimilpa, 61210, Cuernavaca, Mor., Méx.

² Depto. De Microbiología Instituto de Biotecnología, Universidad Autónoma del Estado de Morelos (IBT-UNAM), Ave. Univ. 1001, Col. Chimilpa, 61210, Cuernavaca, Mor., Méx.

³ Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX, S.C. Ignacio Zaragoza No. 6, Coatepec Harinas, Estado de México, C.P. 51700

INTRODUCCION

El barrenador grande del hueso (*Heilipus lauri* Boheman) figura en la lista de plagas que impiden la libre exportación del aguacate mexicano hacia los Estados Unidos de Norte América (Anónimo, 1995). Es una plaga nativa de México que ha sido reportada en las zonas aguacateras de Hidalgo, México, Morelos, Veracruz y Guerrero (García, 1962).

Este curculiónido con su largo rostrum raspa la epidermis del fruto creando una excavación donde deposita el huevecillo, que después de eclosionar produce una galería hasta establecerse en el hueso donde se desarrolla, pupa y emerge como adulto apareándose y ovipositando para cerrar el ciclo (Salgado y Bautista, 1993). El control de esta plaga mucho se ha dirigido al uso de productos químicos. En control biológico, se conoce a una especie de la familia braconidae como enemigo natural (García, 1962).

En el control microbiano, *Bacillus thuringiensis* se utiliza contra plagas agrícolas, forestales, ornamentales y salud. *B. thuringiensis* es una bacteria del suelo Gram positiva que produce inclusiones proteicas cristalinas, denominadas endotoxinas, durante el proceso de esporulación. La bacteria patógena causa enfermedad a sus hospederos por invasión de tejidos, debido a la producción de toxinas que libera en el interior del intestino de la larva. Se han descrito siete diferentes toxinas para este microorganismo, de ellas la delta endotoxina es la más ampliamente estudiada, contenida en un cristal paraesporal proteínico, el cual es termolábil y soluble en soluciones alcalinas (Aronson *et al.*, 1986).

El cristal es polimórfico, por lo que los serotipos se diferencian en composición y cantidad de cadenas polipeptídicas. La toxina está presente como una protoxina, la cual se hidroliza a una forma activa por enzimas proteolíticas intestinales del hospedero. Al ingerir los insectos el cristal, éste es solubilizado y la protoxina es activada por las proteasas. *B. thuringiensis* induce la formación de poros en la membrana tanto en las células epiteliales en el intestino de los insectos como en células intestinales cultivadas. Estos cambios fisiológicos provocan que el insecto deje de alimentarse y muera por falta de alimentación y/o infección bacteriana (Höfte y Whitely, 1989).

Los trabajos de genética de *B. thuringiensis* describen la presencia de más de 50 genes, denominados *cry* que codifican para proteínas insecticidas relacionadas, las cuales se denominan proteínas *Cry*. Estos genes en base a su similitud estructural y espectro de toxicidad se han dividido en varias clases: específicos para lepidópteros (*cry1* y 9), específicos para dípteros y lepidópteros (*cry2*), específicos para coleópteros (*cry3*, 7 y 8), específicos para dípteros (*cry* 4, 10 y 11) y específicos para nemátodos (*cry12,13,14* y 15) (Feitelson *et al.*, 1992 y Crickmore *et al.*, 1995).

Son muchos los productos comerciales basados en diferentes cepas de esta bacteria, los cuales se encuentran disponibles a nivel mundial bajo distintos nombres y marcas comerciales. Así como también existen algunas compañías que están actualmente desarrollando investigación en la producción de insecticidas a base de *B. thuringiensis* (Feitelson *et al.*, 1992).

En base a las propiedades de la deltatoxina como un elemento potencial de investigación en el control de *H. lauri*, éste trabajo intentó estudiar las proteínas **Cry** capaces de reconocer los sitios de unión al epitelio intestinal de esta plaga.

MATERIALES Y METODOS

Este trabajo fue desarrollado conjuntamente con investigadores del Instituto de Biotecnología de la UNAM-Cuernavaca, Morelos y del Centro de Investigaciones de Biotecnología de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM). El trabajo se desarrolló en distintas etapas: a) Colecta y disección del insecto. b) Preparación de los tejidos de *H. lauri*. c) Biotinilación de las delta endotoxinas. d) Ensayos de unión específicas al tejido intestinal.

En el centro experimental Tierra Blanca perteneciente a la Fundación Salvador Sánchez Colín-CICTAMEX, S.C., se colectaron frutos con daño de barrenador en árboles del cultivar Hass. En el laboratorio, las semillas de los frutos se abrieron cuidadosamente para obtener las larvas de 3-4 instar. Las larvas vivas se colocaron sobre una placa de unisel y se fijaron sus extremos con alfileres que detuvieran al insecto. Con una navaja muy fina se fueron abriendo longitudinalmente a la altura media del cuerpo para retirar la piel y dejar al descubierto el intestino medio. Con la ayuda de agujas de disección se cortaron los extremos del intestino y se utilizó la parte media de éste, el cual se sumergió en el fijador Bouin Hollande's 10 % sublimado incubado por 24 horas, posteriormente se lavaron con agua destilada durante 12 horas y se transfirieron a etanol al 70 % .

La preparación del tejido epitelial consistió en la deshidratación lenta del tejido para incluirlo finalmente en paraplast y llevarlos a cortes histológicos de 5 micras en un plano longitudinal y se secaron a 40 °C durante 72 horas.

Un grupo de laminillas fueron tratadas con las toxinas y las otras no. Las toxinas o proteínas producidas por *B. thuringiensis* empleadas en el laboratorio fueron: **Cry3A**, **Cry3B**, **Cry3C**, **Cry8A** específicas contra coleópteros; **Cry1Aa** para lepidópteros y una nueva proteína del tipo **Cry3** (IB 31) nativa mexicana.

El marcaje de las toxinas mencionadas se realizó mediante la biotinización de éstas previamente purificadas por gradiente de sacarosa o columnas de intercambio y reveladas por la estreptavidina acoplada a peroxidasa o mediante el uso de anticuerpos monoclonales **antiCry1A** (4D6) y **antiCry1E** (16A5) y posteriormente se agregó un segundo anticuerpo **anti-IGg** de ratón acoplado a peroxidasa.

Los ensayos de unión se realizaron aplicando 0.3 ml de la solución de toxina marcadas (con biotina) sobre el tejido epitelial previamente desparafinado e hidratado, incubado por espacio de una hora, seguido a esto se lavó por un minuto con BTST para eliminar toda aquella toxina que no se unió al intestino y finalmente se incubó con 0.3 ml de estreptavidina acoplada a peroxidasa o los anticuerpos. En el caso en que se utilizaron anticuerpos, se incubaron durante una hora y posteriormente se utilizó un segundo anticuerpo acoplado a peroxidasa, finalmente se incorporó en solución DAB

(Diaminobencidina) más peróxido de hidrógeno, que revela la presencia de la toxina mediante un precipitado oscuro. La muestra se deshidrató nuevamente y se secó en una plancha a 40 °C y finalmente se selló con resina. Las observaciones se hicieron en microscopio compuesto que permitió visualizar los sitios de unión de las toxinas con el epitelio del barrenador *H. lauri*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Observaciones al microscopio compuesto de cada uno de las proteínas mostraron resultados interesantes en el reconocimiento. Las proteínas **Cry1Aa** y **Cry3** (IB 31) se unieron levemente a las microvellocidades del epitelio intestinal de *H. lauri*. Estas mismas proteínas libres de biotina, incubadas con los anticuerpos monoclonales **anticry1A** (4ID6) y **anticry1E** (16A5) respectivamente, fueron visualizados con mayor nitidez en el tejido intestinal. En ningún caso, **Cry1Aa** o **Cry3** (IB31) se unieron a otros órganos (tejido muscular, tráqueas, tubulos de Malpighi) además de las microvellocidades de *H. lauri*.

Bravo *et al.*, (1992a y b) demostraron mediante estudios inmunoquímicos que la delta endotoxina efectivamente se une a la microvellocidad apical del intestino de larvas alimentadas con diferentes toxinas. Estos resultados establecen una alta probabilidad de toxicidad de estas proteínas hacia *H. lauri*. Sin embargo, análisis más finos de la interacción de estas toxinas con el epitelio intestinal y los bioensayos respectivos podrán aclarar la posible correlación entre unión específica *in vitro* y toxicidad. La unión de la proteína **Cry3** (IB31) por ser del grupo de especificidad a coleópteros era de esperarse, mientras que la unión de la proteína del tipo **Cry1Aa** con especificidad al grupo de lepidópteros no es clara. Sin embargo, los genes de proteínas tipo **Cry3** presentan cierta homología con los genes **Cry1** y **Cry4** en el dominio tóxico, por lo que aparentemente hubo algún tipo de reconocimiento (Höfte y Whitely, 1989). En la figura 1 y 2 se muestran las respuestas de unión para las proteínas **Cry1Aa** y **Cry3** (IB31) en el epitelio de *H. lauri*. revelado con anticuerpos monoclonales específicos, mientras que en la figura 3 se ilustra un resultado negativo de acoplamiento usando la proteína biotinizada, donde no existió reconocimiento a las microvellocidades de la plaga.

Fig. 1. Unión de la proteína **Cry1Aa** tratada con anticuerpo monoclonal sobre las microvellocidades del intestino medio de *Heilipus lauri*.

Fig. 2. Unión de la proteína **Cry3** (IB31), tratada con anticuerpo monoclonal sobre las microvellocidades del intestino medio de *H. lauri*.

Fig.3. Respuesta negativa de unión de la proteína **Cry3B** biotinizada, sobre las microvellocidades del intestino medio de *H. lauri*.

CONCLUSIONES

Existió un reconocimiento de las toxinas **Cry1Aa** y **Cry3** (IB31) a las microvellociades del epitelio intestinal medio de *Heilipus lauri*. El uso de anticuerpos monoclonales en el reconocimiento de sitios específicos al epitelio intestinal permitió seleccionar aquellas proteínas de una manera inequívoca y con nitidez. En un futuro, esto abre la posibilidad de seguir estudiando a estas toxinas como un mecanismo de biocontrol.

LITERATURA CITADA

Anónimo. 1995. Diario Oficial, 3 de julio.

Aronson A.I., W. Beckman and P. Dunn. 1986 . **Bacillus thuringiensis** and related insect Pathogens. Microbiol. Rev. 50: 1-24.

Bravo A., S. Jansens and M. Peferoen. 1992a. Immunocytochemical localization of **Bacillus thuringiensis** insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. J. Invertebr. Pathol. 60: 237-246.

Bravo A., K. Hendricky., S. Jansens and M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical analisis of especific binding of **Bacillus thuringiensis** insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. 60: 247-253.

Crickmore N., D. Zeigler R., J. Feitelson., E. Schnepf., B. Lambert., D. Lereclus., J. Baum and D. H. Dean. 1995. Revision of the nomenclature of **Bacillus thuringiensis** cry genes. Microbiol. Rev. En prensa.

Denolf P., S. Jansens., S. Van Houdt ., M. Peferoen ., D. Degheele and J. Van Rie. 1993. Biotinylation of **Bacillus thuringiensis** insecticidal crystal proteins. Appl. Environ Microbiol. 59: 1821-1827.

Feitelson J.S., J. Payne and L. Kim . 1992. **Bacillus thuringiensis**: Insect and beyond. Biotechnology 10: 271-275.

García A., P. 1962. **Heilipus lauri** Boheman un barrenador de la semilla o hueso del aguacate en México. Tesis Profesional. ENA. Chapingo, México. 107 p.

Höfte H. and H. Whitely. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of **Bacillus thuringiensis**. Microbiol. Rev. 53: 242-255.

Salgado S., M y N. Bautista. M . 1993. El barrenador grande del hueso del aguacate (**Heilipus lauri** Boheman) en Ixtapan de la Sal, Mexico. *In*: Memoria de Actividades Fundación Salvador Sanchez Colín- CICTAMEX, S.C. Rubí. A.M. (ed.). Coatepec Harinas, Méx..pp: 225-231.