

Screening Transgenics Unveils Apparent Resistance to Hornworm (*E. ello*) in the non-Transgenic, African Cassava Clone 60444



Chavarriaga P¹, Prieto S², Herrera C.J¹, Lopez D¹, Bellotti A.C¹ and Tohme J¹
 (1) Centro Internacional de Agricultura Tropical, AA 6713, Cali, Colombia. E-mail: p.chavarriaga@cgtar.org
 (2) Currently at CENICAFE, Chinchina, Colombia

PS4-18

INTRODUCTION

Erinyx ello (L), Sphingidae, is one of the most important pests of cassava in the neotropics (Bellotti et al. 1992). It has a wide geographic range, covering from Brazil, Argentina and Paraguay to the Caribbean and southeast USA. The insect can produce yield losses up to 64%, as well as planting material losses of 72% (Arias and Bellotti, 1984).



CIAT has elaborated an Integrated Pest Management-IPM-program to help control the hornworm. More than 500 varieties of the cassava collection have been tested looking for resistance. Recently, a possible source was detected when transgenic plants of cassava, from African cultivar 60444, carrying one cry1Ab gene, were challenged with larvae of first instars. The non-transgenic controls turned out to be resistant. Here we summarize the experiments carried out to confirm the initial observations.

OBJECTIVE

- Determine the effect of leaves from transgenic and non-transgenic cassava plants, cultivars 60444 and CMC-40, of first instar hornworm larvae fed on them.

MATERIALS AND METHODS

Transgenic plants were maintained in biosafety greenhouses. Some of the bioassays were carried out in the greenhouse or under controlled conditions in the laboratory. First instar larvae were fed on transgenic lines L27, L80 and L92, all derived from cultivar 60444. Non-transgenic plants from the same cultivar, plus the susceptible cultivar CMC-40, were also used as controls to feed them. Weight gain and mortality were scored every 24 h until pre-pupa or pupa stages started appearing.



RESULTS

Most larvae fed with transgenic and non-transgenic lines derived from cultivar 60444 died by day five or six, and their average weigh did not exceed 0,5 g; none reached the pupa stage. Contrastingly, those fed on CMC-40 lasted until day twelve; reached their highest weight at day eleven (average beyond 3 g) and most became pupa. There was only one larva, fed on transgenic line L27, whose weight was close to 2 g by day eight, although it did not gain extra weight afterwards, and did not became pupa.

Table 1 depicts two statistically different groups classified on the basis of days to death and percentage of mortality. Twenty five percent of the larvae fed on CMC-40 died by day six, while more than 70% of larvae fed on 60444 died by day 5 or 6.

Table 1

Line or Cultivar	Average Days to Death	% Mortality (days alive)
CMC-40	6.6 A	25 (13)
L-27	4.4 B	80 (13)
L-80	3.6 B	100 (6)
L-92	3.5 B	100 (6)
60444	3.1 B	100 (6)

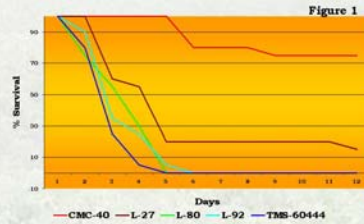


Figure 1

Figure 1 confirms that survival of those larvae fed on CMC-40 was higher than those fed on 60444, transgenic and non-transgenic lines. Only one larvae fed on L27 survived beyond day 12 but did not transform into pupa.

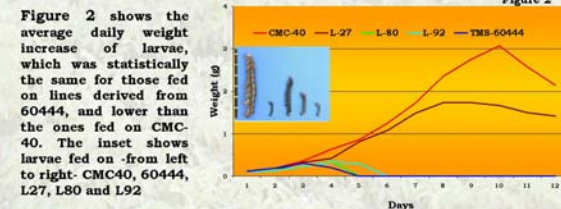


Figure 2

Figure 2 shows the average daily weight increase of larvae, which was statistically the same for those fed on lines derived from 60444, and lower than the ones fed on CMC-40. The inset shows larvae fed on -from left to right- CMC40, 60444, L27, L80 and L92

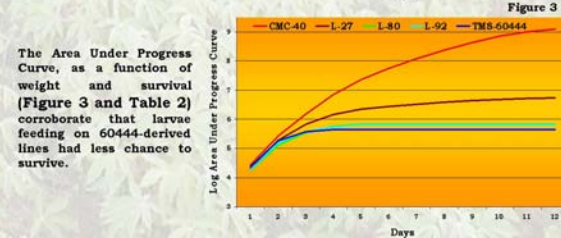


Figure 3

The Area Under Progress Curve, as a function of weight and survival (Figure 3 and Table 2) corroborate that larvae feeding on 60444-derived lines had less chance to survive.

Table 2

Genetic Material	Area under Curve
CMC-40	9.1176 A
L-27	6.7492 B
L-80	5.8309 C
L-92	5.8156 C
TMS-60444	5.6588 C

CONCLUSIONS

Cultivar 60444 may contain genes for resistance to the hornworm, an observation that needs to be confirmed in the field, in cassava growing areas where the pest is endemic. It is worth noting that 60444 derives from crosses with the wild species *Manihot glaziovii*, a species known to be the source of resistance to ACMD. If there was an effect of the cry1Ab gene inserted in the transgenic lines, it was masked by the strong insecticidal effect of the cultivar 60444.

REFERENCES

- ARIAS B; BELLOTTI AC. 1984. Revista de la Sociedad Colombiana de Entomología, 10(3-4):28-35.
- BELLOTTI AC; ARIAS B; GUZMAN OL. 1992. Florida Entomology 75:506-515.
- CIAT. 2002. La Yuca en el Tercer Milenio: sistema modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización/copulada y dirigido por : Bernardo Ogasana, Hernán Ceballos - Cali-Colombia: La Investigación y Desarrollo de la Yuca. Proyecto IFO Mejoramiento de yuca. 586p.

COMPARACIÓN DE LA ADAPTABILIDAD DEL BIOTIPO "B" DE *Bemisia tabaci* A YUCA COMERCIAL Y SILVESTRE



A. CARABAL¹*, A.C. BELLOTTI² & J. MONTOYA-LERMA²



Universidad del Valle

INTRODUCCIÓN

Yuca (*Manihot esculenta*) es la principal fuente nutritiva y de calorías para muchos habitantes de África y Asia (Hillocks et al. 2000). En varios países de este último continente su cultivo está limitado por la enfermedad del mosaico Africano de la yuca (ACMD) (Fig. 1A), causada por geminivirus (MGs), los cuales son transmitidos por el vector *Bemisia tabaci* (Homóptera: Aleyrodidae) (Fig. 1B).

B. tabaci en asocio con el mosaico ocasiona pérdidas económicas estimadas entre 12-25% del total de cultivos de África (Thresh et al. 1997). Aunque se ha especulado que la ausencia del virus de ACMD en las Américas está relacionada con la inhabilidad de *B. tabaci* de colonizar yuca (Costa & Russell 1975) a principios de 1990, *B. tabaci*, fue encontrado alimentándose de este cultivo en República Dominicana (Brown, datos no publ.) y Cuba (Vásquez et al. 1995). Dada la marcada polifagia de *B. tabaci* sumada a su fácil adaptabilidad a nuevos hospederos, existe la posibilidad de que se adapte a especies silvestres y, posteriormente a variedades comerciales de *M. esculenta*.

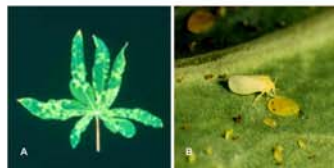


Fig. 1A: Hoja de yuca afectada con ACMD. Fig. 1B: Adulto y ninfas de *B. tabaci*.

Todo lo anterior plantea potenciales pero serias amenazas ante la posibilidad de la introducción de ACMD en las Américas, en especial si se tiene en cuenta que los más tradicionales cultivares de yuca son altamente susceptibles a la enfermedad (Bellotti & Arias, 2001).

Con el objetivo de verificar esta posibilidad se realizaron bioensayos, midiendo y comparando el desarrollo de las poblaciones del biotipo B de *B. tabaci* encontrado en Colombia sobre una especie silvestre *Manihot carthagenensis* y una variedad de yuca comercial, *M. esculenta* MCol 2063.

MATERIALES Y MÉTODOS

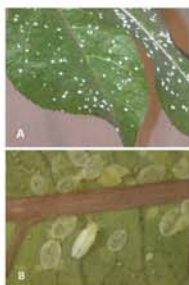


Fig. 2. A y B: Biotipo "B"

B. tabaci: La cepa *B. tabaci* Biotipo "B" (Fig. 2A) fue obtenida a partir de individuos de una colonia establecida en CIAT (Cali, Colombia). Esta fue criada por cinco generaciones sobre *J. gossypifolia* (Euphorbiaceae), en jaulas de tul y madera (1x1x1m) bajo condiciones controladas de 25:12°C, 70:5% HR y 12 horas de fotoperíodo.

La pureza de la cepa del biotipo B fue verificada periódicamente sobre especímenes adultos utilizando RAPD-PCR (CIAT, 1999).

Yucas silvestres: Cuatro plantas de *Manihot tristes* (Mueller) *Manihot peruviana* (Mueller) y *Manihot carthagenensis* (Jacq.) Mull. Arg. de 40 días de edad fueron introducidas en jaulas de tul y madera de (1mx1mx1m) e infestadas con pupas de quinta generación de *B. tabaci* próximas a emerger, provenientes de *J. gossypifolia* (Fig. 2B). Los insectos permanecieron durante una generación en cada especie silvestre. En este período se realizaron observaciones del desarrollo de los estados inmaduros para determinar sobre cual de las tres especies silvestres *B. tabaci* presentaba una mayor tasa de supervivencia.

Biología y parámetros demográficos:

Basados en los resultados del establecimiento de *B. tabaci* en las tres especies silvestres de *Manihot*, se eligió la mejor adaptada (*M. carthagenensis*), para evaluar los cambios que experimentan las poblaciones de *B. tabaci* en longevidad, fecundidad, tiempo de desarrollo, tasa de supervivencia y parámetros demográficos sobre esta especie y compararlos con los obtenidos sobre la variedad comercial *M. esculenta* (MCol 2063).

Longevidad y fecundidad. Cuarenta parejas de *B. tabaci*, recién emergidas provenientes de *J. gossypifolia* fueron individualizadas en jaulas pinza y colocadas en el envés de las hojas de *M. carthagenensis* y *M. esculenta* (MCol 2063). Cada 48 horas los adultos fueron removidos a una nueva área de la hoja, hasta la muerte natural de las hembras. La fecundidad fue estimada de acuerdo al conteo del número de huevos colocados por hembra cada 48 horas, y la longevidad como el máximo tiempo (días) que una hembra vive.

Tiempo de desarrollo, tasa de supervivencia y proporción de hembras. Cincuenta adultos de *B. tabaci*, de dos días, fueron tomados de plantas de *J. gossypifolia* y posteriormente colocados en jaulas pinza sobre el envés de las hojas de *M. carthagenensis* y *M. esculenta* (MCol 2063). Después de seis horas los adultos fueron retirados y se seleccionaron al azar 200 huevos. Se registró el tiempo de desarrollo de huevo-adulto, la tasa de supervivencia de los estados inmaduros y la proporción de hembras emergidas.

Parámetros demográficos. Los datos del tiempo de desarrollo fueron combinados con datos experimentales de la reproducción $L_n m_n$ para generar tablas de vida, usadas para calcular los parámetros demográficos definidos por Price (1975): 1) Tasa de reproducción neta (R_0), 2) Tiempo generacional (T), 3) tasa intrínseca de crecimiento de la población (r_m), estimada mediante la ecuación de Carey (1993): $\sum \exp(-r_m x) L_n m_n = 1$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Biología y parámetros demográficos de *B. tabaci* sobre *M. carthagenensis* y *M. esculenta* (Mcol 2063)

La longevidad más alta de las hembras de *B. tabaci* se presentó en *M. carthagenensis*, excediendo en aproximadamente dos días a *M. esculenta*. Al día seis, se alcanzó el 65 y 82.5% de mortalidad en hembras provenientes de *M. carthagenensis* y *M. esculenta*. La tasa de oviposición sobre *M. esculenta* fue 2.5 veces mayor comparada con *M. carthagenensis* (Tabla 1).

Tabla 1. Longevidad media (días), fecundidad media (huevos/hembra), y tasa de oviposición (huevos/hembra/2días) de *B. tabaci* sobre *M. carthagenensis* y *M. esculenta* (n=40).

Parámetro	<i>M. carthagenensis</i>	<i>M. esculenta</i>
Longevidad	5.1 a	3.3 b
Fecundidad	5.4 a	8.6 a
Tasa oviposición	1.1 a	2.6 b

Promedios seguidos por diferentes letras a través de las columnas difieren significativamente, (Kruskal-Wallis P< 0.0001, seguido por Student-Newman-Keuls P< 0.05).

En total el ciclo de vida fue 11 días más largo sobre *M. esculenta* comparado con *M. carthagenensis*. Estos resultados podrían interpretarse como una mejor adaptación biológica de los estados inmaduros del insecto a desarrollarse sobre *M. carthagenensis*.

Los resultados de las tasas de supervivencia mostraron que de 200 huevos, el 60% llegaron hasta adulto cuando se desarrollaron sobre *M. carthagenensis* comparado con el 28% que llegaron a adultos sobre *M. esculenta*. Este parámetro es un buen indicador de la capacidad potencial que puede tener *B. tabaci* para desarrollar poblaciones sobre una variedad comercial de *M. esculenta* (MCol 2063) y una silvestre *M. carthagenensis* (Tabla 2).

Tabla 2. Tiempo de desarrollo (días), tasa de supervivencia (%) y proporción de hembras (%) de *B. tabaci* sobre *M. carthagenensis* y *M. esculenta* MCol 2063 (n=200).

Parámetro	<i>M. carthagenensis</i>	<i>M. esculenta</i>
Tiempo desarrollo (d)*	33.3 a	44.4 b
Tasa supervivencia (%)†	60 a	28 b
Proporción hembras (%)	50	50

Promedios seguidos por diferentes letras a través de las columnas difieren significativamente * Kruskal-Wallis P< 0.0001, seguido por Student-Newman-Keuls P< 0.05, † Chi-cuadrado* 29.9, 1 d.f., P< 0.0001

Los resultados de la tasa reproductiva neta (R_0) permitieron estimar que, en promedio, al cabo de una generación, las poblaciones de *B. tabaci* podrían multiplicarse 8.6 veces sobre *M. esculenta*, siendo 1.6 veces mayor con respecto a *M. carthagenensis*. Estos resultados permiten predecir que el biotipo "B" puede alcanzar diez generaciones por año sobre *M. carthagenensis*, dos generaciones más que en *M. esculenta*.

La población de *B. tabaci* presentó un crecimiento (r_m) igual en *M. carthagenensis* y *M. esculenta* indicando que no existen diferencias en el potencial biótico del insecto al ser criado en cualquiera de estos hospederos y que por consiguiente su potencial adaptativo es igual tanto en la especie cultivada como en la silvestre (Tabla 3).

Tabla 3. Parámetros demográficos de *B. tabaci* sobre *M. carthagenensis* y *M. esculenta* MCol 2063 (n=200).

Parámetro	<i>M. carthagenensis</i>	<i>M. esculenta</i>
R_0	5.4	8.6
r_m	0.048	0.048
T	35.6	44.8

En síntesis, los resultados de este experimento muestran, en forma global, gran favorabilidad de *M. carthagenensis* para el biotipo "B" de *B. tabaci*. Un corto tiempo de desarrollo unido a una alta tasa de supervivencia (Fig. 3) son buenos indicadores de la conveniencia de *M. carthagenensis* para el desarrollo del insecto. Este hecho plantea que las especies silvestres de *Manihot* pueden convertirse en puente intermedio, donde la mosca blanca incrementa su potencial biótico favoreciendo, a posteriori, su completa adaptación sobre *M. esculenta*.



Fig. 3. Supervivencia y desarrollo de estados inmaduros de *B. tabaci* "B" sobre A: *M. carthagenensis* y B: *M. esculenta* MCol 2063

CONCLUSIONES

Basados en los resultados encontrados es posible plantear que las especies silvestres de yuca constituyen hospederos con gran potencial para el desarrollo del biotipo "B" de *B. tabaci* encontrado en Colombia.

REFERENCIAS

Bellotti, A. C. & Arias, B. 2001. Host plant resistance to whiteflies with emphasis on cassava as a case study. *Crop Prot.* 20: 815-823.

Carey, J. R. 1993. *Applied demography for biologist*. Nueva York. Oxford University Press. 206p.

CIAT. 1999. *Integrated pest and disease management in major agroecosystems*. Annual Report, Project PE-1. Cali, CO. 136p.

Costa, A.S., Russell, L.M. 1975. Failure of *Bemisia tabaci* to breed on cassava plants in Brazil (Homoptera: Aleyrodidae). *Cienc. Cult. Sao Paulo*, 27:389-390.

Hillocks, J. M.; Thresh, J. M.; Bellotti, A.C. 2001. *Cassava: Biology, Production and Utilization*. CABI Publishing, Reino Unido. 409p.

Price, P., 1975. *Insect Ecology*. John Wiley & Sons, New York. 514p.

Thresh, J. M., Otim-Nape, G.W., Legg, J.P. and Fargette, D. 1997. African cassava mosaic virus disease: the magnitude of the problem. *African Journal of Root and Tuber Crops* 2: 13-19.

Vásquez, L. L. Jiménez, R. Iglesias, M. Mateo, A. López, D. & Vera, E. R. 1995. Moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) detectadas en los principales cultivos agrícolas de Cuba. *Manejo Integrado de Plagas* (Costa Rica) 36: 18-21.

July 28-30, 2004 - Sooclen XXXI

En pruebas de Plantas Transgénicas, aparecen Indicios de Resistencia de un Clon Africano, TMS-60444, al Gusano Cachón de la Yuca, *Erinnyis ello*.

Herrera C.J.¹, Prieto S.², Chavarrriaga P.¹, López D.¹, Bellotti A.C.¹, Tohme J.¹

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical-CIAT, AA 6713, Cali, Colombia.

E-mail: carulherrerac@ciat.org; p.chavarrriaga@ciat.org;

Ciat-transyuca@ciat.org; a.bellotti@ciat.org; j.tohme@ciat.org.

²CENICAFE, Chinchiná, Colombia



INTRODUCCIÓN

Erinnyis ello (L), familia Sphingidae, es una de las plagas más importantes de la yuca en el Neotrópico (Bellotti et al., 1992). Tiene un amplio hábitat geográfico desde el sureste de Brasil, Argentina y Paraguay hasta la cuenca del Caribe y el sureste de los Estados Unidos. Este insecto llega a afectar el rendimiento en un 64% y pérdidas en el material de siembra en un 72% (Arias y Bellotti, 1984).



Partiendo de las investigaciones realizadas por el CIAT sobre el gusano cachón (*E. ello*), se pudo elaborar un programa de manejo de este insecto empleando las diferentes técnicas que ofrece el Manejo Integrado de Plagas (MIP).

El Banco de Germoplasma del CIAT ofrece a entomólogos y mejoradores más de 6000 variedades de yuca que tienen genes de resistencia a una variedad de insectos plagas. Sin embargo, aún no se ha identificado, mediante una búsqueda sistemática, la resistencia genética al gusano cachón, a pesar de que se han realizado muestreos para resistencia a insectos plaga (CIAT, 2002).

Las novedosas herramientas biotecnológicas que se encuentran disponibles permiten un eficiente y fácil acceso a genes de resistencia y una más rápida manipulación de los niveles moleculares.

Mediante la introducción de un gen (Cry 1Ab) proveniente de *Bacillus thuringiensis*, que ha sido modificado para mejorar su expresión en plantas (plásmidos) junto a otro gen de selección y seguimiento (gus-int, npt II, man) de la transformación, se han obtenido plantas transgénicas de una variedad modelo MNg 11 (TMS 60444). Esta variedad es hija de un material silvestre, *M. gazivoli*, la cual es reportada como un material vegetal que tiene genes de resistencia a varios insectos y una *M. esculenta* que se comporta bien *in vitro* por su alta capacidad para ser transformada y por su regeneración relativamente abundante (CIAT, 2002).



OBJETIVOS

- Determinar el consumo del gusano cachón de la yuca sobre diferentes líneas genéticamente modificadas de la variedad TMS 60444.
- Medir la eficiencia del Gen Cry I en líneas transgénicas sobre el comportamiento alimenticio del gusano cachón de la yuca, *E. ello*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron larvas de gusano cachón obtenidas de cría en laboratorio, todas del mismo estado de desarrollo, i.e. estar, una variedad susceptible, CMC-40, una variedad no modificada genéticamente, TMS 60444 y tres líneas de esta variedad modificadas genéticamente L27, L80 y L92.

Colocando una hoja de yuca en una caja plástica donde se le introdujo una larva de *E. ello* previamente pesada, se evaluó cada 24 horas su ganancia de peso y mortalidad por el consumo de hoja de yuca. Esta hoja es cambiada después de cada evaluación hasta llegar al estado de prepupa.

Al final se obtuvo información suficiente para realizar una curva de mortalidad, de ganancia de peso y una gráfica de área bajo la curva para evaluar el relacionado con el comportamiento alimenticio del gusano cachón.

RESULTADOS

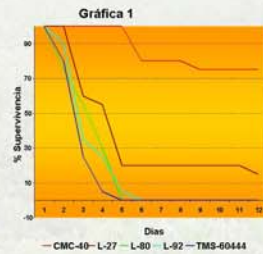
Las líneas transgénicas L-80 y L-90 presentaron un 100% de mortalidad, por consiguiente, ninguna larva llegó al estado de prepupa; sorprendentemente comportó de igual forma la testigo no modificada TMS-60444, estos materiales mostraron la mayor mortalidad en comparación con el testigo absoluto, CMC-40, donde la mortalidad fue del 25% y llegaron al estado de prepupa el 75% de la población.

En la Tabla 1 se pueden observar dos grupos diferentes estadísticamente, en la variable días a la muerte. Se nota que el testigo absoluto, CMC-40, fue el material que más tardó en iniciar la mortalidad, en cambio los otros materiales, como TMS-6044 y las líneas se comportaron estadísticamente iguales y manifestaron su muerte mucho más temprano.

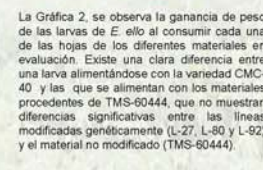
Estos indicios en el comportamiento alimenticio denotan la presencia de genes de resistencia naturales enmascarando la actividad biocida de Bt involucrados en las líneas transgénicas.

Línea o Cultivar	Días a muerte (Primera larva)	% Mortalidad (Días a Muerte)
CMC-40	6.6 A	25 (p)*
L-27	4.4 B	80 (p)*
L-80	3.6 B	100 (5)**
L-92	3.5 B	100 (5)**
60444	3.1 B	100 (5)**

* Llegaron al estado de pupa las larvas vivas.
** Número de días que tardaron en morir el 100%.



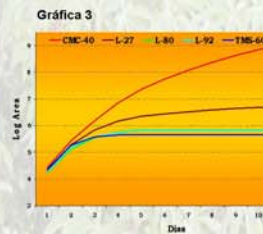
La Gráfica 1 presenta una diferencia significativa en el porcentaje de mortalidad a través del tiempo de evaluación, mostrando que materiales procedentes de la variedad TMS 60444 ocasionan una muerte inmediata de *E. ello* al consumir hojas de este material vegetal; comparado con el suministro de hojas de CMC-40 al gusano cachón, material vegetal susceptible a insectos plaga asociados a yuca.



La Gráfica 2, se observa la ganancia de peso de las larvas de *E. ello* al consumir cada una de las hojas de los diferentes materiales en evaluación. Existe una clara diferencia entre una larva alimentándose con la variedad CMC-40 y las que se alimentan con los materiales procedentes de TMS-60444, que no muestran diferencias significativas entre las líneas modificadas genéticamente (L-27, L-80 y L-92) y el material no modificado (TMS-60444).

Se realizó el cálculo de dicha variable, considerando que el área bajo la curva está en función del peso y la supervivencia. Los resultados mostraron la existencia de tres grupos (Tabla 2 y la Gráfica 3).

Esto muestra que las líneas L-80, L-92 y la variedad TMS-60444 se comportan estadísticamente igual y que el efecto del gen (Cry 1Ab) proveniente de *B. thuringiensis* involucrado en estos materiales, no es el único causante de este efecto de mortalidad de las larvas del gusano cachón (*E. ello*); por el contrario, TMS-6044 (material no modificado genéticamente), probablemente tiene un gen natural de resistencia que puede estar enmascarando la actividad del Bt involucrado en las líneas transgénicas.



Material Genético	Área bajo la Curva
CMC-40	9.1176 A
L-27	6.7492 B
L-80	5.8308 C
L-92	5.8198 C
TMS-60444	5.8588 C

CONCLUSIONES

El descubrimiento de la variedad TMS 60444, con genes de resistencia propios, abre la posibilidad de emprender futuros estudios de fitomejoramiento de variedades comerciales que involucren esta variedad o sus genes como fuente de resistencia en la búsqueda del manejo del gusano cachón de la yuca, importante plaga de este cultivo en los Neotrópicos.



REFERENCIAS

ARIAS, B.; BELLOTTI, A.C. 1984. Pérdidas en rendimiento (daño simulado) causada por *Erinnyis ello* (L) y niveles críticos de población en diferentes etapas de desarrollo de tres clones de yuca. *Revista de Sociedad Colombiana de Entomología* 10(3-4):28-35.

BELLOTTI A.C.; ARIAS, B.; GUZMAN, O.L. 1992. Biological control of the cassava hornworm *Erinnyis ello* (Lepidoptera:Sphingidae). *Florida Entomologist* 75:506-515.

CIAT, 2002. La Yuca en el Tercer Milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización compilado y dirigido por: Bernardo Ospina, Hernán Ceballos. Cali-Colombia: La Investigación y Desarrollo de la Yuca. Proyecto IP3 Mejoramiento de yuca. 2002. 586p. Publicación CIAT No. 327/ISBN 958-694-043-8.

AGRADECIMIENTOS

Al Gobierno de Colombia en su Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, MADR y al DGIS de Holanda por su aporte financiero para el desarrollo del presente trabajo.