

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* Y EXTRACTO DE *Agave lechuguilla*  
PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith).**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

**RAFAEL CASTRO FRANCO**

MONTERREY, N. L. MEXICO

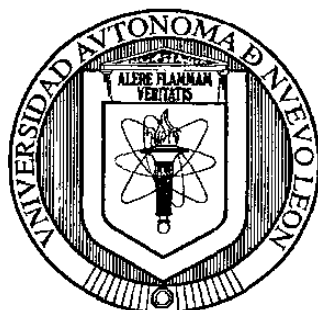
JUNIO DE 1994

TD  
Z532  
FCB  
1994  
C3



1020112264

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO



**DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* Y EXTRACTO DE *Agave lechuguilla*  
PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith).**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA  
OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

**RAFAEL CASTRO FRANCO**

MONTERREY, N. L. MEXICO

JUNIO DE 1994

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* Y EXTRACTO DE *Agave lechuguilla*  
PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith)**


**TESIS  
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER DEL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA**

**POR**

**RAFAEL CASTRO FRANCO**

**APROBADA**

**COMISION DE TESIS**



**DR. JOSÉ SANTOS GARCÍA ALVARADO  
PRESIDENTE**



**DR. LUIS J. GALÁN WONG  
SECRETARIO**

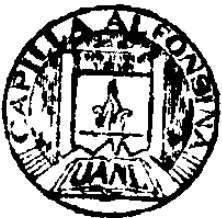


**FONDO T.F. 18**

**DR. ARTURO GALLEGOS DEL TEJO  
VOCAL**

0099-64260

TD  
ZS320  
FCB  
1994  
C 3



**FONDO TESIS**

**DESARROLLO DE UN BIOINSECTICIDA A PARTIR DE  
*Bacillus thuringiensis* Y EXTRACTO DE *Agave lechuguilla*  
PARA EL CONTROL DE *Spodoptera frugiperda* (J. B. Smith)**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Laboratorio de Biotecnología de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo, bajo la dirección del Dr. José Santos García Alvarado y la asesoría del Dr. Luis J. Galán Wong y del Dr. Arturo Gallegos del Tejo.

A MI QUERIDA ESPOSA  
ROCIO ELVIRA AGUAYO  
CON TODO MI AMOR Y RESPETO POR SU  
PACIENCIA Y APOYO SIN EL CUAL NO  
HUBIERA PODIDO LLEGAR A LA META QUE  
ME PROPUSE

A MIS HIJOS  
OZUKY  
YARETH  
RAFAEL  
BENDICION QUE ME DIO  
MI DIOS

A MI PADRE (Q.P.D.)  
JESUS CASTRO CONTRERAS  
COMO UN TRIBUTO POSTUMO  
A SU MEMORIA

A MI MADRE  
CONCEPCION FRANCO VDA DE CASTRO  
POR SU INFINITO AMOR

AL PUEBLO DE MEXICO



VIVID EN EL TRANQUILO AMBIENTE DE LOS  
LABORATORIOS Y LAS BIBLIOTECAS  
PREGUNTAOS ANTE TODO  
¿QUE HE HECHO POR MI PATRIA?  
ASI ALCANZAREIS QUIZA LA  
DICHA DE SABER QUE CONTRIBUISTEIS  
AL BIENESTAR DE LA HUMANIDAD

LUIS PASTEUR

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, por haberme permitido que dentro de sus aulas, laboratorios y bibliotecas tuviera la oportunidad de realizar mis estudios doctorales, en ella arde siempre la flama de la verdad.

A la Universidad Autónoma Chapingo, por su patrocinio económico y moral para la realización de mis estudios doctorales. En especial a los directivos de la URUZA, Ph D. Ruben Meléndez González, M. Sc. Buenaventura Reyes Chacón y M. C. Ricardo Trejo Calzada, al C. Rector de la UACH Ing. Carlos Orozco Alam , y al ex-director Académico de la UACH M. C. Omar Arana Muñoz.

Al Instituto "18 de Marzo" de Gómez Palacio, Dgo. por haberme inculcado el espíritu de lucha, estudio y superación académica; por permitirme pasar los mejores años de mi vida estudiantil, y en él aprender a querer y respetar a mi Patria.

Al Dr. José Santos García Alvarado, quien siempre encontró tiempo disponible para atender mis dudas. Sus valiosos consejos, su desinteresado apoyo y sincera amistad, me permitieron mantener el ánimo necesario para cumplir con el compromiso contraído.

Al Dr. Luis J. Galán Wong, quien preocupado por lograr un alto nivel en esta investigación, estableció contactos con científicos de vanguardia para intercambio de experiencias; sus consejos, y las discusiones sostenidas con él, permitieron mantener un ritmo siempre ascendente en el desarrollo de este trabajo. Mi más sincero reconocimiento y gratitud.

Al Dr. Arturo Gallegos del Tejo, quien pendiente por encontrar un valor agregado a las plantas del desierto, me otorgó parte de su original idea de investigar actividad insecticida en la lechuguilla, sustento de este trabajo, por su amistad, consejos, apoyo y asesoría.

Al personal del Laboratorio del Microbiología Industrial y del Suelo de la FCB por su solidaridad en la realización de este trabajo, y muy especialmente a las M.C. Katuska Arévalo Niño y Patricia Taméz Guerra, en ellas encontré siempre apoyo técnico desinteresado y oportuno.

A mis compañeros de estudio y al personal no académico de la Facultad de Ciencias Biológicas. La convivencia y lazos de amistad desarrollados durante mi estancia, el intercambio de opiniones en los seminarios y pláticas informales complementaron grandemente mi formación científica. Muchas de las ideas que surgieron en esos intercambios, están plasmadas en este documento. Para todos ellos mi agradecimiento sincero.

## INDICE

### PAGINA

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABLAS

DEDICATORIA

RESUMEN EN ESPAÑOL

RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)

INTRODUCCION

OBJETIVOS e HIPOTESIS

ANTECEDENTES

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES

PERSPECTIVAS SOBRE FUTURAS

INVESTIGACIONES EN EL TEMA

LITERATURA CITADA

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	<b>Acido desoxiribonucleico</b>
<b>ARN</b>	<b>Acido ribonucleico</b>
<b>cm</b>	<b>Centimetros</b>
<b>Cry</b>	<b>Toxinas proteicas</b>
<b>DL<sub>50</sub></b>	<b>Dosis letal media</b>
<b>g/l</b>	<b>Gramo (s) por litro (s)</b>
<b>h</b>	<b>Hora (s)</b>
<b>ha</b>	<b>Hectàrea (s)</b>
<b>Kda</b>	<b>Kilodaltones</b>
<b>Km<sup>2</sup></b>	<b>Kilòmetro (s) cuadrado (s)</b>
<b>lb</b>	<b>Libra (s)</b>
<b>m</b>	<b>Metros</b>
<b>M</b>	<b>Molar</b>
<b>ml</b>	<b>Millilitro (s)</b>
<b>mm</b>	<b>Milimetros</b>
<b>msnm</b>	<b>Metros sobre el nivel del mar</b>
<b>N</b>	<b>Normal</b>
<b>%</b>	<b>Porciento</b>
<b>p</b>	<b>peso</b>
<b>pH</b>	<b>Logaritmo negativo de la concentraciòn de iones H<sup>+</sup></b>
<b>PcCi</b>	<b>Proteinas cristal insecticida</b>
<b>serovar.</b>	<b>Serovariedad</b>
<b>Spp.</b>	<b>Especie desconocida</b>
<b>Subesp.</b>	<b>Subespecie</b>
<b>UI</b>	<b>Unidades internacionales</b>
<b>UV</b>	<b>Ultravioleta</b>
<b>Var.</b>	<b>Variedad</b>

## RESUMEN

El objetivo de este trabajo consistió en desarrollar un bioinsecticida a partir de las inclusiones y esporas de *Bacillus thuringiensis* serovariedad *aizawai* (cepa GM-10) y extracto de guishe (subproducto del procesamiento de *Agave lechuguilla*) para el control del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*, Smith). Para determinar la toxicidad del extracto sobre las plantas, se instaló un experimento en invernadero con cultivos susceptibles a los cuales se les impregnó el producto en las hojas, y se determinó el peso seco final. Para establecer el efecto de ese producto sobre *S. frugiperda* se realizaron bioensayos encontrándose que el extracto alcohólico mostró una actividad insecticida de 20 % de mortalidad a una concentración de 100 µg/ml en la dieta. Posteriormente se procedió a hacer una mezcla del extracto con las inclusiones y esporas de *B. thuringiensis*, encontrándose un efecto sinérgico entre los componentes y obteniéndose un 100 % de mortalidad al utilizar una mezcla de 236 µg/ml del complejo inclusion-espora más 100 µg/ml del extracto en la dieta para insectos.

Como soporte de las formulaciones se analizaron la harina de maíz cruda, la pregelatinizada y la nixtamalizada, encontrándose que la harina de maíz nixtamalizada fue la más eficaz ya que se polimerizó en frío y formó redes matriciales adecuadas. Como agentes protectores de luz solar se probaron los compuestos verde de malaquita, rojo congo y carbón vegetal, resultando el verde de malaquita el mejor protector en pruebas de laboratorio. Se utilizaron aceites de maíz crudo y comestible como estimulantes del apetito de insectos.

Con estos antecedentes se realizó un experimento en campo con cultivo de maíz (*Zea mays* variedad H-507). Al emerger las plantas y que estas alcanzaron una altura de 90 cms, se hizo un conteo de larvas de *S. frugiperda* a 100 cogollos por tratamiento antes de aplicar el bioinsecticida y después de siete días.

La evaluación del rendimiento del grano cosechado (en Kg/Ha) entre los diferentes tratamientos, mostró una diferencia estadística altamente significativa; observándose tres grupos, el primero abarcó aquellos donde el rendimiento medio fue desde 3211 hasta 2440, el segundo de 2284 y el tercero de 1083, éste último correspondió al control absoluto.

Se concluyó que: a) La cepa GM-10 de *B. thuringiensis* var. *aizawai*, sola y combinada con extractos de guishe, mostró ser efectiva para el control de *S. frugiperda*, b) el extracto alcohólico del guishe mostró ser un magnífico coadyuvante al actuar como agente sinérgico tanto en pruebas de laboratorio como en campo; c) el compuesto verde de malaquita actuó como un buen protector solar de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis*; d) el formulado encapsulado en matriz de harina de maíz resultó ser altamente eficiente como cebo para el combate de *S. frugiperda*, y e) fue posible incrementar el rendimiento de maíz hasta en 2.0 Ton/Ha de grano al hacer uso de este formulado.

## INTRODUCCION

Es posible que los antiguos agricultores observaran que las plagas eran uno de los tantos factores que incidían sobre la producción agrícola, ya en la biblia se menciona una de las plagas agrícolas que azotó a Egipto durante la época de Moisés, sin embargo es obscura la página de la historia que mencione alguna forma de combate. Posiblemente se necesitó de más de 5,000 años para que el hombre estableciera métodos de producción capaces de satisfacer las necesidades de una sociedad cada vez más compleja. Los detalles más antiguos de la era moderna con respecto al combate de insectos-plaga, se encuentran plasmados en la enciclopedia de horticultura recopilada por J. C. Loudon en 1824, en ella se encuentran los más variados métodos de control biológico (enemigos naturales de los insectos, control con plantas repelentes, cultivos trampa y control con otros compuestos naturales) que datan de más de 1700 años en el sureste asiático y de más de 100 años en los Estados Unidos de América (131).

Con la introducción de la agricultura y de la ganadería, el hombre no volvió a verse obligado a depender del medio, ya que empezó a modificarlo para sus propios fines, y a menudo, desgraciadamente con la misma rapidez, a degradarlo, a destruirlo hasta hacer imposible la misma vida humana en algunas zonas. A pesar de la dramática urgencia, la preocupación por el medio ambiente es reciente y comprendida por pocos. De aquí la necesidad de buscar la forma de mantener el equilibrio entre el hombre y su medio ambiente, si la sociedad necesita productos agrícolas, estos deben obtenerse con métodos eficaces y seguros, sin exponer a la destrucción el patrimonio físico y biótico de las futuras generaciones, concepto que hoy se llama desarrollo sostenible.

Para aumentar los rendimientos unitarios se desarrollaron compuestos tóxicos para el combate de plagas y con ello se inició la producción masiva de los llamados plaguicidas químicos. Es tal la demanda de esos productos, que actualmente se conocen 1500 variedades en el mundo, los cuales han elevado en espiral el costo económico y energético del producto agrícola final (107).

Aunque en México, el consumo de insecticidas químicos se hizo frecuente sobre todo en agricultores empresariales en la década de los años 50, la demanda de estos ha aumentado

anualmente en un 15% , en tanto que el rendimiento de los cultivos ha disminuido en un 15 al 25% debido al ataque de plagas; posiblemente esto se deba a que hayan aumentado los mecanismos de defensa en los insectos (153). Este problema va asociado a los efectos nocivos que causan los plaguicidas, entre los más notables estan: la contaminación, el incremento en la resistencia de las plagas, la supresión de los enemigos naturales de las plagas y consecuentemente la resurgencia de plagas secundarias, lo que constituye un circulo vicioso: resurgencia-mayor cantidad de plaguicidas-resurgencia.

El enfoque ecológico en el control de plagas cobra cada día más adeptos debido a que en este contexto se analizan las relaciones bióticas entre especies y los peligros que encierran el uso de agentes químicos inespecificos. Esto ha promovido la necesidad de desarrollar una tecnología que involucre el uso de medidas de control que no dejen residuos peligrosos en el medio ambiente. En este contexto el uso de bioinsecticidas y de coadyuvantes naturales ofrece una alternativa más fácil y segura para la salud del humano y para la estabilidad del agroecosistema (60,141,159).

Es por eso que en este trabajo desarrollamos un formulado con acción insecticida para el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz a base del microorganismo *B. thuringiensis* serovar. *aizawi* cepa GM-10 y extractos de guishe, el cual es un subproducto del procesamiento de la lechuguilla (*Agave lechuguilla*) durante la obtención de fibras, para lo cual originalmente se planteó la siguiente:

## **HIPOTESIS**

Una formulación a base de *B. thuringiensis* y extractos de *A. lechuguilla* es efectiva para el control de *S. frugiperda* en cultivos de maíz (*Zea maiz*)

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Desarrollar un formulado altamente tóxico utilizando *B. thuringiensis* serovar *aizawi* y extractos de *A. lechuguilla* para el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz.

### Objetivos Particulares

1. Probar a nivel de laboratorio la eficacia de las combinaciones:  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* y extractos de guishe en bioensayos contra *S. frugiperda*.
2. Determinar a nivel de campo la eficacia de la formulación del bioinsecticida contra *S. frugiperda* en el cultivo de maíz.
3. Demostrar que el uso del extracto de guishe como coadyuvante incrementa la actividad tóxica del formulado.
4. Demostrar que el extracto del guishe no produce efectos fitotóxicos o alelopáticos.
5. Seleccionar una harina de maíz para la encapsulación efectiva de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis*.
6. Escoger un compuesto cromógeno capaz de proteger las toxinas de *B. thuringiensis* de la exposición a la radiación solar.



## ANTECEDENTES

### HISTORIA DE *B. thuringiensis*

El nombre de *B. thuringiensis* fué introducido primeramente por el biólogo alemán E. Berliner en 1911 (16), cuando describió una bacteria patógena encontrada en una pupa de la mariposa harinosa del mediterraneo (*Ephestia kuehniella*) y otras larvas de insectos no especificadas que viven en graneros en la ciudad de Thuringen. La descripción de *B. thuringiensis* hecha por Berliner fue la siguiente: "Un bacilo esporulado gram (+), con flagelos peritricos, que al terminar el crecimiento vegetativo, contiene además de la espora una inclusión a la cual designa como un cuerpo de desecho".

Esta bacteria ya había sido previamente reconocida por el biólogo japonés S. Ishiwata en 1901 (91) como un agente causal de la enfermedad de sotto de las mariposas de la seda (*Bombyx mori*), el cual denominó *B. sotto* (103). En 1915, Aoki y Chigasaki demostraron que cultivos viejos de *B. sotto* contenían una toxina que causaba la muerte de insectos. Posteriormente, en 1927, Mattes confirmó la observación de Berliner, estableciendo además que el crecimiento del cuerpo de desecho en la bacteria cambiaba también la posición de la espora. (1,49).

Posteriormente *B. thuringiensis* se describió como una variedad dentro de *B. cereus*, porque con excepción de su patogenicidad para ciertos insectos y la forma oblicua de la espora en las células, resultaba indistinguible de *B. cereus* (154,). Fue hasta en 1951 en que se aisló una cepa, la cual fue denominada *B. cereus* serovar. *alesti*, que era causante de toxemia y septicemia en larvas del gusano de seda, además se observó que estos síntomas variaban con la cantidad de cultivo ingerido por la larva. (81).

En 1953, mediante el uso de la microscopía electrónica se observaron cultivos esporulados de *B. thuringiensis* y se encontró la presencia de inclusiones las cuales tenían forma de diamante, refiriéndose a éstos como un cuerpo paraesporal. Hasta ese tiempo, nadie relacionaba esto con una función de patogenicidad. Sin embargo, Hannay sugirió que los cristales al encontrarse en el intestino medio del insecto, estaban relacionados con la formación de una toxina que inducía una septicemia en las larvas (66,82).

La relación entre la inclusión y la patogenicidad hacia el insecto, fue confirmada entre 1953-1954, aunque se observó que la primera requería ser solubilizada en álcali diluido o jugo intestinal del insecto para ser activo (4). La patogenicidad de esta bacteria para las larvas de insectos está basada principalmente en las proteínas tóxicas que contiene el cuerpo paraesporal, sin embargo, la patogenicidad de las cepas de *B. thuringiensis* está restringida a cierto grupo taxonómico de insectos (92).

En 1969, H.T. Dulmage aisló una cepa de *B. thuringiensis*, la cual denominó HD-1, que resultó entre 20 y 200 veces más potente que todas las cepas conocidas. Esta cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) es actualmente la base comercial de la mayoría de este tipo de productos contra diversas plagas de lepidópteros de importancia agrícola comercial (46,47).

La primera clasificación serológica en base a los antígenos flagelares para este grupo de bacterias fue hecha por De Barjac (36). En 1977 se aisló la primera cepa de *B. thuringiensis* patógena para larvas de mosquitos (8,72) y otras especies de dípteros, la cual también implicó el descubrimiento de un nuevo serotipo (37). Más recientemente, se aisló una cepa denominada (B1 256-82) que fué activa contra larvas de coleópteros, esta cepa correspondió al serotipo 8a 8b (38,97,98).

### **ECOLOGIA DE *B. thuringiensis***

**Distribución y frecuencia.** Esta es una bacteria con una amplia distribución y alta frecuencia de aislamiento en la naturaleza, ya que ha sido encontrada a partir de muestras de suelo (40,125, 130,158), de granos almacenados, (66,119) de insectos, (49,138) así como de sitios infestados con estos últimos (8).

En un análisis de 8,916 muestras de suelo de varios hábitats, incluyendo aquellos con diferentes números de insectos, los resultados indicaron que la presencia de insectos no predice la presencia de *B. thuringiensis* en una muestra de suelo particular (110). Estos estudios también mostraron que esta bacteria tiene una extensa distribución mundial en diversos suelos incluyendo suelos forestales, de savanas, y de desiertos. Sin embargo, en la fracción de muestras provenientes de ambientes abiertos y naturales, se aisló al microorganismo en 115 muestras, de un total de 785 analizadas. Estas últimas fueron obtenidas tanto en Estados Unidos como en otros 29

países. Por otra parte se encontró que la densidad relativa de esta bacteria es mucho mas bajo en los suelos que la encontrada en almacenes de granos (111).

Otros investigadores sugieren que *B. thuringiensis* puede habitar en tan solo dos ecosistemas separados: tierras arables y almacenes de granos. Las esporas pueden sobrevivir por muchos años pero no germinan ni se multiplican como células vegetativas en los suelos naturales, esta observación indica que esta bacteria no está adaptada al ambiente del suelo (41).

**Persistencia de *B. thuringiensis* en el medio ambiente.** La baja duración de la actividad de la toxina es una desventaja de *B. thuringiensis*, esta ha sido calculada de 1 a 2 días en el campo y de dos semanas si se aplica forestalmente, esto debido a que la toxina se destruye por acción de la luz ultravioleta. El hecho de que sea mejor su actividad para plagas forestales que de campo, es debido en parte a la alta susceptibilidad que tienen las plagas forestales a las toxinas del microorganismo (15).

### **TOXINAS DE ACCION INSECTICIDA DE *B. thuringiensis***

Esta bacteria y sus variedades sintetizan 7 tipos de toxinas, entre los que se encuentran la  $\alpha$  y  $\beta$  exotoxinas, la  $\delta$ -endotoxina, "el factor piojo", una bacteriocina (thuricina) y dos inhibidores de la respuesta inmune de los insectos denominados InA e InB.(51). Las dos primeras toxinas presentan efecto plaguicida sobre un amplio espectro de artrópodos,(96) mientras que la  $\delta$ -endotoxina actúa sobre un grupo reducido de insectos, nemátodos, protozoarios (52,118,157) y células tumorales (136,137), además de presentar otras actividades biológicas como el incrementar la respuesta inmune y actuar como un coadyuvante en mamíferos (135).

**$\alpha$ -exotoxina:** Esta toxina, también denominada lecitinasa o fosfolipasa (99), es una enzima termolábil que se acumula durante la fase de crecimiento exponencial de algunas variedades, es capaz de romper muchos tipos de células y es tóxica para *Galleriae mellonella* y la mosca aserrada de los pinos (43). Esta proteína también puede ser sintetizada por *B. cereus* (100).

**$\beta$ -Exotoxina (Factor Mosca):** Esta es una toxina termoestable, secretada durante el crecimiento exponencial por algunas variedades de *B. thuringiensis* como la serovar. *thuringiensis* (145,150,151). Químicamente, la  $\beta$ -exotoxina es una adenina con un residuo de glucosa y ácido alárico (58,164). Es altamente tóxica para moscas y varios otros tipos de insectos (22,152).

Aunque el modo de acción de esta toxina no es muy claro, se ha demostrado que bloquea la mitosis, e inhibe a la ARN polimerasa dependiente de ADN de células de mamíferos y de bacterias causando mutaciones (25). Se ha encontrado que en células sanguíneas humanas provoca incremento de las aberraciones cromosomales. También se ha demostrado que inhibe la mitosis en meristemos de raíz, simulando el efecto de la colchicina y vinblastina (151). Por las anteriores propiedades mutagénicas y teratogénicas, su uso como insecticida no está permitido en Norteamérica y Europa, sin embargo, sí es producido y usado en Rusia (64).

Asimismo, *B. thuringiensis* produce enzimas extracelulares, ya que en estas residen también su patogenicidad, estas enzimas dañan la membrana peritrófica y facilitan el acceso de la  $\delta$ -endotoxina o de bacterias al epitelio del intestino, produciendo otras enzimas de tipo proteasas que se sintetizan durante el inicio de la esporulación y son necesarias para el completo éxito del proceso de toxicidad. Todas estas enzimas muestran en conjunto una acción de virulencia junto con la  $\beta$ -exotoxina y la  $\delta$ -endotoxina (84,85,88,95).

**$\delta$ -Endotoxina.** De las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, esta es la más importante para el control biológico de insectos plaga (59). Esta proteína es sintetizada en forma de protoxina durante el proceso de esporulación dentro de la célula vegetativa y aparece como inclusión cristalina, considerándose una característica constante para las variedades de esta bacteria (28). A esta inclusión se le adjudican algunos sinónimos, tales como cuerpo paraesporal o cristal proteico, sin embargo, solamente la porción activa debe ser considerada  $\delta$ -endotoxina (23,108,127,154). A esta parte tóxica se le denomina PsCI. Generalmente, las PsCI son codificadas por genes que se localizan en megaplásmidos, pero algunas también se han localizado en el cromosoma bacteriano (103).

La estructura primaria de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* varía con la codificación del gen, la gran mayoría de estos últimos ya han sido identificados y clasificados (87). Se ha demostrado que los genes pueden ser transferidos en forma natural entre diferentes cepas de *B. thuringiensis*. Este proceso explica la combinación de diferentes inclusiones parasporales. Además, algunos de los genes han mostrado tener elementos de transposición alguno de los cuales pueden ser "cortados" y redistribuidos en el genoma bacteriano. La estructura terciaria de las proteínas varía según las subespecies, y por otra parte, la habilidad que presenta esta bacteria para

producir sus toxinas varía de cepa en cepa y puede depender también de las condiciones del cultivo (26,48,124).

La mayoría de las inclusiones contienen más de una proteína; p. ej. la inclusión de *B. thuringiensis kurstaki* HD-1 contiene 5 diferentes polipeptidos, tres CryI y dos CryII. Existen varias interacciones complejas, incluyendo ligaduras hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, y disulfuro que ligan a la proteína junto a el cuerpo parasporal (21). Posiblemente la estructura principal de las inclusiones sean glicoproteínas de estructura primaria, además de que esta estructura tiene un papel muy importante en el efecto tóxico, porque estas toxinas de *B. thuringiensis* cuando son clonadas en *E. coli* son generalmente equitóxicas a las toxinas de las que fueron derivadas (123).

Las ligaduras disulfuro de la proteína son importantes para el mantenimiento de la estructura parasporal. Por ejemplo., en las toxinas CryI, el C-terminal, una cuarta parte de la proteína contiene cisteína, que usualmente son encontrados como cistina, el contenido de 1.1. a 1.9% es suficiente para 7 a 12 ligaduras disulfuro, aunque aparentemente no son necesarias para las toxicidad en lepidópteros (6). La estructura tridimensional y domino de la toxina ha sido explorada inmunológicamente, las proteínas CryI y CryII mostraron ser antigenicamente distintas. En parte el modo de acción puede ser atribuido a una estructura diferente, ya que algunas regiones del C-terminal son específicamente necesarias para las células receptoras. Mientras que la conformación estructural de la la proteína se mantenga inalterada, la heterogeneidad en la secuencia de los aminoácidos puede tener poca importancia en la toxicidad (95).

Las protoxinas mayores, de aproximadamente 130-140 Kda requieren de un procesamiento para activarse. Esta acción es mediada por el pH alcalino y las proteasas del intestino medio del insecto, dando como resultado una toxina de 60 a 70 Kda que son derivados del último cuarto del C-terminal de la protoxina (21). La actividad de la toxina bajo condiciones naturales ocurre como sigue: a) es solubilizada en el pH alcalino del intestino medio y b) es procesada por proteasas específicas.

La degradación de la proteína CryIA ocurre en una secuencia de siete ordenes específicas desde el comienzo hasta el C-terminal de la protoxina y procediendo a través de la región N-terminal. Los fragmentos producidos de C-terminal son de aproximadamente de 10 Kd, y

rápida­mente proteolizados en pequeños péptidos (33). No se conoce el mecanismo exacto de como ocurre esta degradación tan precisa. Las proteínas resistentes producidas de *B. thuringiensis* de 125 a 135 Kda son las menos estables como toxinas contra lepidópteros, probablemente porque el fragmento del C-terminal en la formación de la inclusión paraporal es mucho más estable (6).

El tamaño de los fragmentos activos de proteína-resistente, varía con la cepa de *B. thuringiensis*. En general para las protoxinas CryI, solamente ocurre una proteólisis limitada en la N-terminal mientras que son removidos alrededor de 500 aminoácidos del C-terminal. Por ejemplo, en la CryIA el fragmento tóxico se encuentra entre los aminoácidos 29-35 y 599-607 (86) en tanto que en el CryIVb se encuentra entre el aminoácido 30 al 695. En contraste los CryII, CryII CryIVD no sucede esto ya que aparentemente la proteína se encuentra rota (163).

#### **Dominio y toxicidad.**

La toxina activada puede ser dividida en tres regiones estructurales: la región N-terminal; el dominio tóxico (aminoácidos del 1 al 279); que consiste en diversas regiones hidrofóbicas conservadas; una región conservada C-terminal (aminoácidos del 461 al 695) y una región variable entre estas dos regiones que contiene la mayoría de las diferencias entre aminoácidos (33).

#### **MODO DE ACCION DE LAS TOXINAS CON ACCION INSECTICIDA DE *B. thuringiensis*.**

**Mecanismos de acción de la Delta-endotoxina.** Los cambios estructurales en el intestino medio de los insectos causados por la toxina de las serovariedades *san diego* y *kurstaki* de *B. thuringiensis* muestran que la hinchazón causada en dicha parte del intestino, es muy semejante en ambas cepas (128). Entre las diferencias que se han observado entre ellas, se indican las siguientes: ausencia de lesiones de membranas y daño microvillar en la serovar. *san diego* (128). En tanto que la serovar. *kurstaki* causa trastornos en el plasma, en las membranas mitocondriales y en la membrana nuclear, así como pérdida de la estructura interna de los microvellos del intestino de los insectos lepidópteros después de 15 min de haber sido ingerida (102).

Para explicar la causa de la hinchazón causada por la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* serovar. *san diego*, ha sido propuesto un modelo de lisis osmótico coloidal. Sin embargo esta serovariedad no produce lesiones de membrana, daños moleculares y es de respuesta lenta en el epitelio, esto hace suponer que existen mecanismos diferentes de acción para la  $\delta$ -endotoxina de este microorganismo entre variedades. Estas diferencias resultantes se deben a variaciones en el ambiente del intestino del huésped, solubilidad de la toxina Cry, estructura de la toxina e interacción de ésta con receptores de la membrana o bicapa lipídica (53).

Después de que una larva de insecto ingiere el cuerpo paraesporal de *B. thuringiensis*, diferentes acciones pueden ocurrir. Debido a que el medio ambiente alcalino del intestino de la mayoría de las larvas es desfavorable para la germinación y multiplicación de esta bacteria, es más probable que las esporas ingeridas permanescan intactas, pero la inclusión es solubilizada y fragmentada en porciones tóxicas, causando una deformación estructural en las células epiteliales del intestino desintegrando la membrana microvillar, y produciendo por consecuencia la destrucción del intestino. Esto provoca que se paren las funciones del intestino, baje el pH del fluido intestinal y los nutrientes sean liberados, los cuales permiten la germinación de las esporas de la bacteria y la multiplicación de las células vegetativas (32). En estas condiciones, el microorganismo invade los tejidos del cuerpo de la cavidad larval. Eventualmente la larva para de comer y muere. Una invasión microbiana secundaria puede acelerar la muerte, cerrando un ciclo de vida cuando el cadáver es consumido y la bacteria es liberada al medio ambiente como esporas. La exacta cronología de los eventos probablemente difiera en varios insectos, dependiendo del pH y otros parámetros del tracto intestinal (5).

Recientemente han sido propuestas tres hipótesis con respecto al modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis*, la primera es que las toxinas de la bacteria inhiben las ATPasas de la membrana plasmática; la segunda indica que las toxinas del microorganismo incrementan la permeabilidad selectiva de  $K^+$  ; y la tercera que las toxinas forman un poro inespecífico (45,71,155).

## **ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO Y MEJORAMIENTO DE EFECTIVIDAD DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.**

La alta especificidad de la toxina producida por *B. thuringiensis* puede ser una desventaja cuando un cultivo agrícola es atacado por diferentes tipos de insectos. Esta limitante se puede contrarrestar de tres formas:

- a) mediante el aislamiento y la selección de cepas con amplio espectro de huéspedes,
- b) por la transferencia de genes entre diferentes cepas para producir cepas nuevas con mayor espectro insecticida , y
- c) transferencia de genes a otras especies (24,73).

La selección de una cepa silvestre efectiva de un microorganismo entomopatógeno y la manipulación genética para mejorarla, junto con los requerimientos nutricionales de la misma, desempeñan un papel muy importante para el desarrollo de un insecticida microbiano.

Las estrategias generales de desarrollo de productos de segunda generación se podrían resumir como sigue: a) la expresión del gen de delta-endotoxina de *B. thuringiensis* en cepas relativamente cercanas (v.g. *B. cereus*, *B. megaterium*); b) inserción del gen de la delta-endotoxina dentro de plantas-inhabitable epifitas o endofitas; c) inserción del gen de la delta-endotoxina dentro de sistemas capaces de proliferar en medios acuáticos (v.g. algas verde-azul, para controlar mosquitos); y d) inserción del gen de la delta-endotoxina dentro del genoma de las plantas, haciendo que ellas mismas elaboren su insecticida.

La baja estabilidad de la delta-endotoxina en el medio ambiente se debe a que diversos factores ambientales, tales como la luz solar (139) y el contenido y tipos de taninos del follaje de los cultivos, actúan negativamente sobre ella (109). Una de las posibles alternativas para incrementar la presencia de la toxina es la clonación del gen de esta proteína en otra bacteria con el fin de obtener microcápsulas biológicas con la célula recombinante dándole protección a la toxina (162).

## **DESARROLLO DE RESISTENCIA**

La resistencia a los plaguicidas por los insectos ha sido considerada un impedimento en la producción agrícola pero no ha sido tratada como un caso económico, en otras palabras los



agricultores empresariales prefieren gastar más dinero en el combate de plagas resistentes, utilizando plaguicidas químicos que buscar alternativas.

Comparado con los agentes de control químico, el uso de *B. thuringiensis* debe ser considerado como un agente de biocontrol de bastante utilidad y seguro para utilizarse en el manejo integral de insectos plagas (27,56,68). Esto se apoya en que el fenómeno de resistencia es casi nulo para los insectos blanco (69,76,113,160), y además, porque las cepas de de esta bacteria se dispersan ampliamente e invitan a desarrollar menos resistencia de los insectos plaga (103).

Actualmente se conoce que a varias especies de insectos plaga, dentro de las cuales se incluyen *H. virescens*, *Leptinotarsa decemlineata*, *P. interpunctella* y *P. xylostella*, les ha sido demostrada a nivel de laboratorio su habilidad para adaptarse a las toxinas de *B. thuringiensis* y desarrollar resistencia. *P. xylostella* se ha encontrado ampliamente resistente a nivel de campo, por lo cual se ha propuesto la alternativa del manejo integral de plagas (114,93).

*B. thuringiensis* produce varias toxinas que tienen una alta resistencia pasiva a los sistemas inmunes de los huéspedes (51), aunque la literatura solamente contiene tres reportes sobre el desarrollo de resistencia a la delta-endotoxina. Uno es el desarrollo de resistencia de hasta 100 veces más a una formulación comercial utilizada para la palomilla del granero *P. interpunctella*, que fue observada después de 15 generaciones (42).

Dentro de las especies de insectos blanco no todas son igualmente sensibles a las toxinas de *B. thuringiensis* (PsCI), por ejemplo el gusano soldado es menos susceptible que el falso medidor. Entre las desventajas de la exposición de larvas de insectos a altas dosis de un toxico está el desarrollo a la resistencia. El expresar las PsCI es considerada como una herramienta muy útil en los programas de manejo integrado de plagas (103).

Algunos investigadores han llamado la atención acerca del desarrollo de la resistencia de plantas modificadas genéticamente (78), ya que esto prolongaría la efectividad y traería como consecuencia un desarrollo de la resistencia para PsCI; para esto se ha sugerido que las poblaciones de insectos deberán ser expuestas a una combinación de diferentes toxinas. Otras medidas deberán ser la restricción de la expresión de la toxina en cuanto a tiempo o limitando éstas a los órganos económicamente importantes de la planta.

## **VENTAJAS Y DESVENTAJAS DEL USO DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE PLAGAS.**

Varios factores influyen para incrementar significativamente el uso de *B. thuringiensis* en el control biológico de plagas:

- a) la mayoría de los insectos plaga de importancia económica y salud humana está desarrollando resistencia a varias clases diferentes de insecticidas químicos utilizados contra ellos; por otra parte, la toxina de *B. thuringiensis* no promueve un desarrollo rápido de resistencia.
- b) el costo social asociado con el uso de insecticidas químicos, está incrementándose debido a daños al ambiente y salud humana; y
- c) los costos directos del desarrollo y producción de los insecticidas químicos derivados de la petroquímica están en constante escalamiento.

La investigación de *B. thuringiensis* se ve favorecida por tres grandes tendencias a nivel mundial:

- 1) una mayor demanda para el control biológico de insectos plagas (94,101).
- 2) la relativa inestabilidad en el medio ambiente de los productos de *B. thuringiensis*; y
- 3) la frecuencia de éxito de actividad insecticida encontrada.

En comparación con los compuestos químicos sintéticos.(45) El producto aplicado es de 10-50 g alrededor de  $20 \times 10^{40}$  moléculas por hectárea. La potencia molecular de las toxinas de *B. thuringiensis* comparada con otros plaguicidas es 300 veces más alta que los piretroides sintéticos, ya que se aplican  $6 \times 10^{22}$  moléculas por hectárea y 80,000 veces más alta que los organofosforados, de los cuales aplican  $20 \times 10^{24}$  moléculas por hectárea (61).

Las ventajas y desventajas del control biológico se discuten a continuación:

Ventajas:

- a) Alta especificidad. Ejemplos: ausencia de efectos tóxicos en organismos no blanco y mamíferos; uso permitido hasta fechas cercanas a la cosecha de los cultivos.
- b) Bajas expectativas a desarrollar resistencia en los insectos observados.

- c) Adaptable a múltiples tipos de formulaciones; potencial de incorporarle a estimulantes que incrementen el apetito, o cebos para hacerlos más atractivos en las formulaciones contra insectos.
- d) Probabilidad de producir formulaciones más potentes y bajar los costos de producción a través de sistemas nuevos de tecnología de fermentación.
- e) Altas probabilidades de que la cepa seleccionada y/o modificada genéticamente pueda ser utilizada como mejor control sobre el insecto plaga que la cepa silvestre de la que provino; o bien, crear cepas de *B.thuringiensis* que tengan nuevos espectros de actividad contra el huésped o incrementar la actividad tóxica (126).

Desventajas:

- a) Espectro de huésped reducido.
- b) Carecer de protección en las patentes para las cepas silvestres.
- c) Se requiere un buen tiempo de aplicación y además, sus efectos son más lentos que los insecticidas químicos.
- d) La actividad tóxica depende de la ingestión, por lo tanto, la actividad de alimentación es vital para su acción, la cual depende de las condiciones ambientales.
- e) Costos relativamente más altos comparados con los insecticidas químicos, lo cual provoca que su distribución y uso esté limitado.
- f) Baja persistencia en el medio ambiente.

Por otra parte, los factores que afectan la viabilidad económica del control biológico de insectos (145), comparados con los métodos químicos tradicionales dependen de las características del insecto plaga, del agente de biocontrol, del cultivo y de los factores socioeconómicos que se enumeran a continuación: 1) rendimiento contra efectos de calidad, 2) espectro de la plaga, 3) la relatividad de ser menos efectivos técnicamente que los agentes de control químico, 4) riesgos, 5) precios relativos de los agentes de control y 6) costo de implementación. Finalmente, el costo del desarrollo de un plaguicida microbiano es menor que el de los plaguicidas químicos, ya que se requieren dos millones de dólares y de uno a dos años para

su registro, mientras que para un plaguicida químico se requieren 40 millones de dólares y siete años para su registro (143).

## **FORMULACIONES DE BIOINSECTICIDAS.**

Son pocos los casos en que los insecticidas se emplean como producto químico puro o técnico, sin formulación alguna, lo más común es emplearlos debidamente formulados, o sea acondicionados para que rindan la mayor efectividad en su uso. En toda formulación (pulverización o aspersión), se distinguen tres clases de componentes: el principio activo, los disolventes y diluyentes, y los coadyuvantes.

**Principio Activo** El principio activo es la materia realmente eficaz contra la plaga que se trata de combatir. De los bioinsecticidas, el más popular en la actualidad es el que se fabrica a base del cristal proteico tóxico de *B. thuringiensis*(5).

**Disolventes y Diluyentes:** Estos actúan como vehículos de la materia activa, y que permiten usar el formulado tal cual o diluyendolo posteriormente en otro vehículo de aplicación, como el agua. Estos materiales son inertes frente a la plaga (65).

**Coadyuvantes:** Pueden ser materiales inertes o aquellos que potencializan al principio activo mejorando su acción propia, entre estos encontramos algunas feromonas o extractos de plantas (65).

Las ectohormonas o más comunmente feromonas, han sido usadas para el control de insectos, las más valiosas son las feromonas sexuales. Estos compuestos podrían ser útiles en estudios preliminares de reconocimiento y la preparación de insecticidas a base de delta-endotoxina de *B. thuringiensis* (105).

De entre los insecticidas derivados de extractos de plantas los más conocidos se encuentra el de piretro, también llamado polvo insecticida persa o polvo de dalmata, se elabora de un extracto de flores molidas de la planta *Crysanthemum cinerariaefolium* que pertenece a la familia matricaria o del crisantemo, éste material causa una parálisis en la mayoría de los insectos, generalmente se utiliza en forma comercial como agente sinérgico, tiene la desventaja de que se deteriora rápidamente cuando es expuesto a la luz solar (131).

De la semilla de la *Sabadilla sp.* se obtiene un extracto que actúa como veneno al ponerse en contacto con el estómago de muchos insectos, aunque particularmente no tiene efectos con mamíferos, sí causa irritación en los ojos y en el tracto respiratorio, generalmente se usa asperjando este polvo disuelto en agua del 5 a 20 % (54).

Durante la primera década del siglo XIX se utilizó jabón de aceite de pescado y ballena para el control de insectos, recientemente se ha retomado esta técnica utilizando detergentes en solución del 1 a 2% y algunos jabones, aunque se sabe que ocasionan daños foliares en algunas plantas. Los jabones más efectivos para el control de insectos son aquellos de 12 a 18 carbonos en cadena; el lauril (C-12) es uno de los de más uso común cuya fuente principal es el aceite de coco (54).

El guishe como se le conoce en México, es un producto de desecho del procesamiento de la lechuguilla (*Agave lechuguilla*), esta planta contiene de 8 a 12 % en peso seco de sapogeninas, la mayoría de estas últimas tienen propiedades de detergencia. Este producto ha sido utilizado por algunos productores agrícolas del desierto chihuahuense del país con varios propósitos: a) como mejorador del suelo (materia orgánica); b) para el control de insectos-plaga, en este caso se deja remojar en agua durante aproximadamente 12 h y se aplica por aspersión al follaje de cultivos como el maíz y; c) como nematicida aplicado al suelo en la misma forma que se hace para insectos aéreos (67).

En la selección del material inerte o coadyuvante más adecuada para la formulación que se realiza, hay que tener en cuenta principalmente la estabilidad química del principio activo, la capacidad de absorción de agua, la abrasividad del material inerte, la solubilidad y los efectos de potencialización (65).

**Material encapsulante:** En las últimas 4 décadas la formulación de plaguicidas químicos a recibido un notable interés y recientemente la de la microencapsulación de bioplaguicidas. Esta última es una tecnología relativamente reciente, ideal para empacar líquidos, sólidos y gases en pequeños recipientes o cápsulas. La microcápsula es en esencia una estructura que envuelve una cantidad discreta de materia. El tamaño de la cápsula depende arbitrariamente del objeto a encapsular, del material encapsulante y del proceso de elaboración, sin embargo, se da el nombre

de microcápsula a aquellas que solo tienen de dimensión desde micrometros hasta unos cuantos milímetros de diámetro (62).

*B. thuringiensis* se encápsula en matrices de almidón, esta técnica tiene las siguientes ventajas: a) es una carnada que permanece en la hoja, b) estimula la alimentación y c) el almidón es económico. La mayoría de los formulados encapsulados son elaborados con almidón de maíz. Este material proviene de la pregelatinización del almidón con productos patentados tales como Mira-gel y Mira-sperse (115,117).

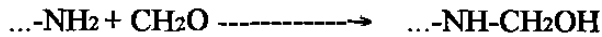
Al respecto, México cuenta con una tradición milenaria en el uso del maíz, ya que culturalmente los habitantes de mesoamérica desarrollaron la nixtamalización del maíz, éste, tiene la propiedad de gelatinizarse con moléculas que se arreglan en forma de red o matriz. La nixtamalización consiste en un tratamiento alcalino del grano de maíz, una cocción y molienda; Los cambios fisicoquímicos que alteran las moléculas primarias da como resultado una masa compuesta de 80-90% de almidón pregelatinizado, y algunas modificaciones de los aminoácidos formandose compuestos nuevos como el del aminoácido N-(DL-2-Amino-2-Carboxy Etyl)-L-Lisina que le dan una mayor probabilidad de formar enrejados anisótropos durante la nixtamalización (13,18,34,35,90,104,120).

El método más corriente de modificación de las sustancias proteínicas naturales para dar productos artificiales o semi-sintéticos consiste en el tratamiento con formaldehído. Este proceso químico produce un "endurecimiento" de las proteínas por reticulación tridimensional de sus cadenas peptídicas. Se trata esencialmente de un proceso químico de policondensación (112).

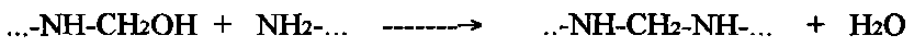
El mecanismo completo de las reacciones entre las proteínas y el formaldehído se desconoce con detalle. Se supone que la reticulación tridimensional tiene lugar principalmente por formación de puentes de metileno del formaldehído entre grupos imino de la proteína:



También son posibles procesos como:



Seguidos de:



Se han desarrollado formulados encapsulados de *B. thuringiensis* utilizando almidón de maíz, el cual es un material barato y mantiene en la matriz una humedad relativa mayor a 80%, aunque el tiempo en que ésta disminuye a un 10% es tan solo de 24 horas (50). Simultáneamente se han elaborado formulados de alta viscosidad buscando una mayor persistencia sobre la superficie foliar de los cultivos. Se ha demostrado que la actividad insecticida de la formulación con agentes reológicos no encapsulados decrece significativamente en un periodo de dos semanas cuando se compara con los encapsulados. Esto indica una mayor persistencia de *B. thuringiensis* bajo condiciones encapsuladas (116).

Un material que se encuentra en la naturaleza en forma de polímero es el alginato, este tiene muchos usos comerciales en alimentos, farmacia, e industrias textiles; por su capacidad de formar agregados enrejados muy estables fué probado para usos agrícolas encápsulando células de hongos específicos para el control de malezas (161). A partir de esta técnica, se desarrollaron encapsulados de células microbianas en soluciones acuosas de alginato de sodio y Pyrax. Esta solución se goteó en cloruro de calcio 0.25 M., o gluconato de calcio 0.1 M. para formar microcápsulas esféricas. Al ser probada la sobrevivencia del microorganismo en el medio ambiente, se mostró que esta fué de 12 semanas(63). Posteriormente se utilizó el alginato proveniente de aislados de *Azotobacter vinelandii* para formular agentes para el biocontrol de hongos como *Talaromyces flavus* y *Gliocladium virens*, esta técnica mejorada con manuronato

dió como resultado que se encontrara una sobrevivencia de 84 días, además se observó que el alginato microbiano resultó ser más barato que el comercial (39).

**Estimulantes del Apetito:** Una de las interacciones químicas entre los insectos y las plantas con significancia práctica en agricultura es sin duda la de los estimulantes del apetito, ovoposición o instalación de huevecillos (142).

Las larvas de la mariposa de cola café que se alimenta esencialmente de *Stellaria spp.*, puede ser inducida a alimentarse de otras plantas al impregnar hojas con una pasta conteniendo taninos, los cuales son uno de los constituyentes de *Stellaria* (79). Las cucurbitáceas contienen productos tóxicos para muchos insectos y vertebrados, estas sustancias químicas son clasificadas químicamente como triterpenos tetracíclicos, sin embargo estimulan el apetito del insecto *Diabrotica undecimpunctata howardi*, el cual se alimenta vorazmente de la sandía variedad Hawkesbury que contiene cantidades elevadas de estos químicos (30).

Al probar como estimulantes del apetito a más de 100 compuestos no alimenticios en la superfamilia *Acridoidea*, se encontró que la sapogenina diosgenina y los alcaloides Hordenina y Lobelina componentes de *Schistocera spp.* actúan como estimulantes del apetito aún en concentraciones muy bajas (17).

Existen formulaciones para el control de lepidópteros a base de *B. thuringiensis* en la que se incluyen estimulantes del apetito para insectos. De éstos se han probado el follaje de maíz, el aceite de maíz y un estimulante comercial del apetito llamado *Coax*, además de dietas especiales de mezclas de carbohidratos, lípidos y proteínas, los resultados indican que la adición del fagoestimulante comercial *Coax* podría permitir utilizar una menor cantidad de *B. thuringiensis* en la mezcla sin reducirse la mortalidad (9, 117).

**Protectores de Radiación:** En general las esporas del género *Bacillus* son considerablemente más resistentes a la luz ultravioleta que las células vegetativas, el daño que la luz UV ocasiona está relacionada directamente con la alteración en la conformación del ADN y la aparición de diferentes tipos de fotoproductos, específicamente la formación de dímeros de pirimidina (44) por la exposición a los rayos UV. (44). Uno de los factores que contribuyen a la resistencia de la espora a los rayos UV es la baja cantidad de agua y el alto contenido de ácido dipicolínico depositado en ésta (70).



Debido a que las formulaciones de *B. thuringiensis* contienen esporas e inclusiones de proteínas estas están sujetas a un período de actividad que puede desaparecer rápidamente en el ambiente, esto ha sido atribuido en parte a la sensibilidad que experimentan las esporas e inclusiones de la bacteria a las exposiciones de luz UV (80). Principalmente debido a la inactivación o destrucción causada en la molécula de triptofano (134), ya esta es la molécula de con absorción más intensa de energía en la región del ultravioleta de 250 nm (12).

Se han añadido compuestos cromóforos como el rojo congo, ácido fólico y ácido para-amino-benzóico en formulaciones de *B. thuringiensis* con fines de aumentar la persistencia de la actividad de la delta-endotoxina en el ambiente. Estos compuestos funcionan como protectores contra la luz solar y más específicamente contra los rayos ultravioleta; su aplicación a los cultivos ha sido probada en formulados a razón de 1.0 µg/ml, los resultados muestran que el rojo congo fué el mejor protector contra los rayos ultravioleta en un período de 12 días de exposición (50).

También se han realizado pruebas de campo con protectores solares para formulaciones de bioplaguicidas con compuestos ya comercializados Adjuvant, San-285, Melazas P/yac, Lufilm, Tritin X-100 y ADWNP 66 y algunos polímeros sintéticos que, además de funcionar como protectores solares, minimizan la desecación (121). De la misma manera, se sabe que el uso de partículas de arcilla impiden el paso de los rayos ultravioleta que afectan la viabilidad de muchos microorganismos que habitan en el suelo, de aquí la razón de utilizar este material como protector para células vegetativas o esporas en aplicaciones comerciales de agentes microbianos para biocontrol (3).

### **INSECTO BLANCO.**

El gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (J.B. Smith) del orden: lepidoptera y familia: noctuidae, es un insecto que parece ser nativo de México y constituye la principal plaga del maíz en este país. Se encuentra ampliamente distribuido, registrándose los mayores daños en Michoacán, Guerrero, Morelos, Oaxaca, Veracruz, Yucatán y Quintana Roo. Ataca principalmente al maíz y al sorgo, pero también se ha encontrado en algunas ocasiones causando daños de importancia económica en otros cultivos, se han reportado más de 60 plantas huéspedes

para este organismo, entre las más importantes tenemos: el algodónero, la caña de azúcar, el trigo, la avena, el chile, la cebolla, el camote y la papa (153).

El insecto adulto es una palomilla de color café grisáceo que mide aproximadamente 2 cm de largo por 3.5 cm de expansión alar. Las alas anteriores son de color café grisáceo moteado con pequeñas manchas, unas más claras y otras más oscuras; en el ángulo apical de estas alas se encuentra una mancha blanquecina notoria. Las alas posteriores son de color claro. El insecto adulto es de hábitos nocturnos; durante el día permanece escondido en las grietas del suelo, y donde es difícil localizarlo debido a que su color se confunde fácilmente con este; también se puede encontrar bajo el follaje. Cada hembra deposita alrededor de 1000 huevecillos, estos son de color verde pálido y de forma esférica; son depositados en el envés de las hojas en masas de 50 a 100 huevecillos, quedando cubiertos por un material algodonoso de color blanco; su período de incubación es de 4 a 5 días. La larva es de color café con tres bandas longitudinales de color claro en el dorso a todo lo largo de su cuerpo, quedando éstas colocadas una en la región media dorsal y las dos restantes en la región latero-dorsal. La larva completamente desarrollada mide alrededor de 3.5 cm de longitud (153).

Las larvas neonatas se alimentan juntas en el envés de la hoja en que nacieron, sin embargo, pocos días después se dispersan en las plantas vecinas y penetran al cogollo, donde ocasionan el daño principal alimentándose de las hojas tiernas, las cuales al desarrollarse presentan perforaciones (153).

El ataque de esta plaga se presenta generalmente desde que nace la planta hasta que alcanza una altura aproximada de 5 cm. Las plantas atacadas se reconocen fácilmente por las perforaciones en las hojas y en el cogollo, donde además es característica la presencia de abundante excremento de las larvas, ya que éstas son muy voraces. La larva atraviesa por seis estadios en un período de tres semanas, después de lo cual se introduce en el suelo para pupar, de donde emerge el adulto una semana más tarde. La pupa es de color café rojizo y tiene una longitud de 2 cm aproximadamente. Este insecto inverna en estado de pupa en el suelo (153).

La presencia de éste insecto en el maíz causa anualmente pérdidas que pueden fluctuar del 10 al 90 % de la producción en campo (153). Su combate se ha basado exclusivamente en la aplicación de insecticidas químicos, sin lograrse resultados satisfactorios, en parte debido a la

habilidad de la plaga para localizar a su planta hospedera y a la relación con la composición de especies vegetales asociadas a los cultivos de maíz. El gusano cogollero del maíz es una plaga de diferentes cultivos en América Latina (83,153). El control del gusano cogollero a base de productos químicos y la liberación de insectos parásitos del huevo no ha sido del todo efectivo (148). Se estima que con un 58 % de daño, este insecto reduce los rendimientos en 1,148 Kg en parcelas con una densidad de 45,000 plantas por hectárea (65).

### **EL USO DE BIOINSECTICIDAS BASADOS EN *B. thuringiensis***

Es un hecho que los agentes de control biológico (bioinsecticidas) han alcanzado muy poca incursión dentro del mercado comercial de los plaguicidas. Tomando en cuenta el total de las ventas mundiales de plaguicidas, se estima que a los agentes de control biológico les correspondió menos del 1 % y en donde *B. thuringiensis* alcanzó el 0.6 % (140). En 1980 el mercado mundial de los productos a base de esta bacteria alcanzaron una venta de 24 millones de dólares a nivel mundial (19).

Actualmente se producen 2,400 millones de toneladas de plaguicidas a nivel mundial,(245) para los cuales, en 1988, el mercado mundial de productos fitosanitarios fue alrededor de 20,000 millones de dólares, de los cuales corresponde un 43.5 % para herbicidas, un 30 % para insecticidas, un 20.5 % para fungicidas y 6 % en productos diversos (hormonas reguladoras de crecimiento, etc.). Del total de ventas para este mercado, 64 millones de dólares correspondieron para los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* (140). Es importante señalar que en 1989, se sembró en Estados Unidos un total de 28 millones de hectáreas de maíz (0.27 millones de Km<sup>2</sup>), para lo cual se utilizaron 9,090 toneladas de diversos productos químicos para el control de los insectos plagas en esa superficie (130), razón que justifica más la búsqueda de nuevas cepas bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* (74).

El algodón en las regiones sureñas y del oeste en E.U.A. fué cultivado en una superficie de 4,700 millones de hectáreas , dejando en 1990 un valor estimado de cuatro mil millones de dólares en ganancias, mientras que el daño por insectos causó pérdidas por 645 millones de dólares. En el caso, fueron responsables particularmente los lepidópteros de las especies de *Heliothis (zea y virescens)*, a las cuales se les atribuyen pérdidas por 216 millones de dólares (129). Otro es el

gusano rosado *Pectinophora gossypiella*, que causó un promedio de pérdidas menor por 71 millones de dólares (148).

**Productos comerciales disponibles y compañías productoras:** En la tabla N° 1 se enumeran los principales productos comerciales basados en diferentes cepas de esta bacteria, los cuales se encuentran disponibles comercialmente a nivel mundial bajo diferentes nombres de marcas comerciales. (64).

**Bioseguridad en el uso de *B. thuringiensis*:** Entre los costos sociales por la aplicación de insecticidas en general se incluyen costos de salud, de hospitalización y por consiguiente, pérdida de trabajos de los pacientes y daños al ambiente, reducción de la cosecha debido a la pérdida de abejas polinizadoras; muerte de ganado, peces, pájaros y mamíferos; pérdida por depredadores naturales de plagas; efectos adversos sobre la fisiología de la planta de cosecha y desarrollo de resistencia de plaguicidas en las poblaciones de plagas. Existen datos que indican el costo social del uso de plaguicidas en Estados Unidos, el cual asciende a dos mil millones de dólares anuales. Esta cantidad es más o menos lo que se gasta en plaguicidas agrícolas (2.2 mil millones de dólares) y alcanza el 25 % de los beneficios netos privados de 8.7 mil millones de dólares que resultan del uso de plaguicidas. Así mismo se calculan en 200 las muertes humanas por año, causadas por plaguicidas. (132,133).

TablaN° 1. Formulaciones comerciales a partir de *B. thuringiensis*.

Nombre comercial	Compañía
<b>Beta exotoxina</b>	
Biotoksybacillin	All Union Inst. Agr. Microbiol. (Rusia)
Eksotoksin	Glavmikrobioprom (Rusia)
Toxobacterin	Glavmikrobioprom (Rusia)
<b>Delta endotoxina</b>	
Agritol	Merck & Co. (USA)
Bakthane	Rohm & Hass (USA)
Bactospeine	Roger Bellon (Francia)

Bathurin	Chemapol-Biokymia (Checo-slovakia)
Biospor	Farbwerkw Hoechst (Alemania)
Biotrol BTB	Nutrilite Prod. (USA)
Dendrobacillin	Glavmikrobioprom (Rusia)
Dipel	Abbott Labs. (USA)
Entocterin	Glavmikrobioprom (Rusia)
Insektin	Glavmikrobioprom (Rusia)
Parasporin	Grain Poc. Lab. (USA)
Sporeine	Libec Laboratoire (Francia)
Truicide	Sandoz-Inc. (USA)

---

Han pasado poco más de tres décadas desde que se empezaron a utilizar las primeras preparaciones comerciales de *B. thuringiensis*, (57) y a la fecha, la bioseguridad es una de las ventajas principales que estos insecticidas microbianos ofrecen en relación a los insecticidas químicos. Diversas razones, entre las que destacan especificidad, virulencia y potencia contra insectos blanco, han convertido a esta bacteria en uno de los candidatos mas atractivos para el desarrollo comercial (143).

Se han reportado casos raros de patogenicidad en mamíferos por *B. thuringiensis*, como el de una salpicadura accidental de Dipel-R en el ojo de un agricultor, el cual dió como resultado una úlcera en la córnea; después de un cultivo de la lesión se confirmo la presencia de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki*. (146,147) Así mismo, existe un reporte de una mastitis bovina fatal causada por este microorganismo (77).

Otros reportes de bacteriemias no infecciosas, muestran la presencia de esta bacteria en tejidos de vertebrados después de haber sido inoculados con dosis altas de esta (89). Por otra parte, se han encontrado efecto de daños por la administración directa de la beta-exotoxina disuelta en soluciones amortiguadoras, donde se ha demostrado que puede ser citotóxica para 5 líneas de células de cultivos de mamíferos, causando hemólisis de eritrocitos de mamíferos (31,156).

### **Dosis de aplicación contra plagas agrícolas, forestales, mosquitos y moscas negras.**

#### *a.- Aplicaciones agrícolas:*

*B. thuringiensis* ha sido usado con éxito contra insectos que se alimentan de hojas. Las dosis recomendadas son de 0.28 a 2.2 Kg/ha (0.25 a 2 lbs por acre), en formulaciones de polvos humectables (145).

El plaguicida-One<sup>R</sup> formulado con *B. thuringiensis* serovar. *san diego* cuando fue utilizado para el combate de *Plagioderia versicolora*, se encontró que realmente suprime el crecimiento del estado larval; sin embargo, se requieren repetidas aplicaciones para los adultos. Las larvas del segundo estadio resultaron más susceptibles que las de tercer estadio y que los adultos de un día (10,11).

*b.- Aplicaciones forestales:*

En una extensa revisión efectuada en este tópico se menciona que las preparaciones humectables de *B. thuringiensis* son efectivas contra los insectos plaga forestales, entre los cuales destaca la palomilla gitana (122,124,154).

*c.- Aplicaciones en plantas ornamentales:*

En la agencia de protección del medio ambiente de los Estados Unidos han sido registradas 124 formulaciones de *B. thuringiensis* que sirven para controlar hasta 15 especies de lepidópteros y otras especies que dañan plantas ornamentales. Mucho de este material es usado para proteger del ataque de plagas a los sistemas de jardines de las carreteras estatales (145).

*d.- Aplicaciones contra mosquito y mosca negra:*

Diferentes cepas de *B. thuringiensis* var. *israelensis* ha mostrado ser altamente activo contra 72 especies de larvas de mosquitos y 22 especies de moscas negras. Los niveles de aplicación basados en polvos primarios y preparaciones de esporadelta-endotoxina secas sin diluir, son utilizados en dosis de 1 mg/ml para mosquitos y de 0.2 mg/l y para moscas negras (14,20,36).

### **Control de *S. frugiperda* por medio de Bioinsecticidas.**

En un estudio para encontrar plantas con actividad bioinsecticida contra el gusano cogollero del maíz (*S. frugiperda*), se realizaron bioensayos con 9 plantas a una dosis de 15 % en peso seco en dieta artificial, los resultados mostraron que las especies de *Solanun spp.* pueden reducir la población hasta en un 50% a la dosis experimentada (2).

Otros investigadores obtuvieron extractos de 4 plantas diferentes, probaron tanto la fase líquida como la sólida, a partir de estos, se desarrollaron bioensayos usando como indicador biológico larvas neonatas de *S. frugiperda*; los resultados obtenidos mostraron que algunas larvas perdían la capacidad de pupar, aunque el trabajo realizado no fue concluyente (144).

En otra investigación se utilizaron los extractos de las siguientes plantas colectadas *Argemone ochroleuca* y *Baccharis salicifolia*, de las cuales se necesitaron dos aplicaciones por semana para el control de la plaga, en tanto que los extractos de *Salpianthus macrodonus*, *Covolvulus alsinoides*, *Ambrosia psilostachya*, *Franseria ambrosoides* y *Guazuma ulmifolia* solo necesitó una aplicación semanal para tal propósito. Sin embargo, los resultados no muestran diferencias significativas entre tratamientos con respecto al rendimiento en grano de maíz (55).

En una prueba para determinar la efectividad de varios insecticidas pertenecientes a diferentes familias de grupos toxicológicos para el control de gusano cogollero del maíz, se evaluaron los siguientes tratamientos en gramos de ingrediente activo/ha. (gia/ha). 1) *B. thuringiensis* (MICR) 32 gia/ha; 2) Metamidofós (FA-OM) 600 gia/ha; 3) AC303630 120 gia/ha; 4) Lambda cyhalotrina (PIR) 21 gia/ha; 5) Triflumorón (RC) 96 gia/ha; 6) Clorpirifós (FH-SE) 480 gia/ha; 7) Deltametrina (PIR) 12.5 gia/ha; 8) carbofurán (CH-MM) 750 gia/ha; 9) cypermctrina (PIR) 60 gia/ha; Metamidofós (FA-OM) 900 gia/ha; 11) *B. thuringiensis* (MICR) 100 gia/ha; 12) Clorpirifós GR (EI-SE) 200 gia/ha; (13 Triflumurón (RC) 48 gia/ha, 14) L. cyhalotrina (PIR) 21 gia/ha y 15 control sin aplicación, se realizaron una o dos aplicaciones según se requirió, dependiendo de la efectividad del producto, se evaluó el nivel de infestación y cinco días después de la segunda aplicación. Los resultados indicaron que la media de plantas infestadas con gusano cogollero al inicio de los tratamientos fue de 77.8% Los productos que protegieron eficientemente al cultivo aún a los 26 días después de la aplicación fueron los tratamientos 4, 5, 7, 9, 12, 13 y 14, con una infestación menor del 10%. Los tratamientos 3 y 6 registraron una infestación del 15.8 y 11.8% respectivamente. En tanto que el resto rebasó el umbral económico regional de 20% de larvas de gusano cogollero, por lo qe requirieron de una segunda aplicación con el consecuente incremento en los costos de producción (106).

En resumen, los formulados que se encuentran en el mercado hechos a base de la delta-endotoxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) carecen de atrayentes específicos, son

poco persistentes, algunos son encapsulados, otros son sólidos y otros más tienen fagoestimulantes, pero el común denominador es que su formulación se encarece substancialmente.

Ante este panorama la necesidad de desarrollar formulados específicos y con alta persistencia en el agroecosistema es evidente. Por esta razón en este trabajo proponemos el uso de la serovariedad *aizawi* de *B. thuringiensis* cepa GM-10, desechos agrícolas como el guishe del *Agave lechuguilla* y harina de maíz nixtamalizada para el desarrollo de nuevas formulaciones, con el fin de ofrecer alternativas a los productores agrícolas para el control biológico de plagas insectiles.

## MATERIAL Y METODOS

### Obtención del extracto del guishe.

El bagazo de *Agave lechuguilla* (guishe), se obtuvo de una procesadora de fibra de este vegetal.

1. La muestra se preparó de la siguiente manera: el bagazo de la *lechuguilla* se secó a la temperatura ambiente durante 30 días; una vez en estas condiciones, se molió en un molino Wiley con tamiz de malla 20, se tomaron 100 g de material seco y molido para cada uno de los siguientes procedimientos:

a) Extracción acuosa: La muestra se colocó en un recipiente de plástico con agua suficiente para cubrir el material, y se dejó en reposo a la temperatura ambiente durante 24 h; b) Extracción alcohólica: el material muestra se colocó en un extractor de reflujo continuo durante 8 h con alcohol etílico al 98% en cantidad suficiente para cubrir el material; c) Extracción ácida: La muestra se colocó en un extractor de reflujo continuo cubiéndose con una solución de ácido clorhídrico 0.1 M durante 4 h; d) Extracción alcalina, se hicieron los mismos pasos que la extracción anterior solo que la solución extractora fue hidróxido de sodio 0.1 M.

2. Separación de los extractos. Una vez hecha la extracción, a cada una de las soluciones, se filtraron por separado con papel Watman 40 para remover pequeñas partículas. El filtrado se



concentró por evaporación hasta la formación de un polvo, el cual se resuspendió en agua destilada al 30 % (p/v).

3. Extracción del compuesto activo. El método empleado para obtener el compuesto activo consistió en tomar una muestra de 5 g. del extracto alcohólico seco del guishe e hidrolizarlo con ácido clorhídrico 1.5 N durante 5 h en un extractor de reflujo continuo, se desechó la fase líquida y se separó el sólido, este se lavó tres veces con agua destilada,, en seguida se paso a un extractor de reflujo continuo y se extrajo el compuesto activo con una solución de ácido acético:acetato de etilo:acetona (2:1:10) durante 4 h, el residuo se desechó y el liquido se destiló con el fin de concentrarlo, de esta manera se colocó en un cristizador y se secó en una estufa de circulación forzada durante 24 h a una temperatura de 40°C. El residuo se pulverizó en mortero .

#### **Fitotoxicidad de extractos de guishe.**

Se instalaron en un invernadero macetas de 1.0 Kg de capacidad, que contenía suelo molido, tamizado y fumigado con bromuro de metilo procedente de un predio agrícola. En ellas se cultivaron plantas de algodónero var. Deltapine (*Gossypium hirsutum* L.G.). lechuga (*Lactuca sativa* D. L.) variedad mesa 659 y papa comercial (*Solanum tuberosum* D L.), los cuatro se sometieron a extractos alcohólicos, acuosos y alcalinos de guishe, en concentraciones de 10, 25, 50 y 100 % (pv). El diseño de tratamientos fué un factorial de 4 x 4 y un testigo con un diseño experimental al azar con tres repeticiones, dejando 2 plantas por unidad experimental. Las soluciones se aplicaron con un rociador para pelo después de cuatro semanas de que las plantas emergieron, la aplicación se hizo uniformemente sobre la superficie foliar hasta cubrirla totalmente, se realizaron por tratamientos subsecuentes dos veces por semana. No se aplicaron fertilizantes, ni plaguicidas en los cultivos. El riego se hizo con una probeta aplicando una lamina de 1.5 cm para cada uno de los tres cultivos. Se determinó la presencia de plagas y enfermedades, los cultivos mostraron una sanidad aceptable. Al transcurir 10 semanas después de la emergencia se procedio a cortar las plantas, secarlas y pesarlas en una balanza analítica.

#### **Actividad insecticida de *B. thuringiensis* cepa GM-10 contra *S. frugiperda*.**

La cepa GM-10 de *B. thuringiensis* se cultivó en 100 ml de medio de cultivo basal en matraces Erlenmeyer de 500 ml de capacidad durante 72 hrs a 25 °C, el paquete celular se separó por centrifugación y se precipitó con lactosa-acetona. El precipitado se secó en una estufa de circulación forzada (48). Con la mezcla de esporas-inclusiones se formularon los tratamientos en dosis de 0, 50, 100, 250 y 500 µg/ml.

#### **Actividad biológica de los extractos de guishe contra *S. frugiperda*.**

Los extractos de guishe fueron puestos en recipientes de vidrio (cristalizador) y se secaron en una estufa de circulación forzada durante 24 hrs a una temperatura de 60°C. El residuo de cada uno de ellos se pulverizó en mortero y con el se preparó un ensayo teniendo como insecto blanco a *S. frugiperda*, se probaron 4 tratamientos y un testigo con cuatro repeticiones y un diseño experimental al azar.

#### **Bioensayos.**

Los bioensayos de la actividad de los extractos del guishe (*A. lechuguilla*), y de la delta-endotoxina de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda* se hicieron utilizando el método de A. Burgerjon (22).

Los extractos se administraron a los insectos mezclados en las dietas, de la siguiente manera: La composición de la dieta usada para cría y bioensayos de *S. frugiperda*, como se muestra a continuación: Agua destilada 3,000.00 ml, Harina de soya 241.80 g, Germen de trigo 108.00 g, Sal Wesson's 36.00 g, Azúcar 43.80 g, Para-metilhidroxibenzoato 5.40 g, Acido sórbico 3.24 g, Aureomicina 0.48 g, KOH (22 por ciento) 18.00 ml, Solución vitamínica\* 12.00 ml, Cloruro de colina (15 por ciento) 24.90 ml, Formaldehído (10 por ciento) 15.00 ml, Acido acético (25 por ciento) 39.90 ml, Agar-agar 34.80 g. La preparación se efectuó mezclando los sólidos y los líquidos en el medio total de agua destilada a excepción del agar, el cual se disolvió por separado con calor, y cuando este tuvo una temperatura de 60 °C se mezclaron ambas partes, para evitar la descomposición de la solución vitamínica. Una vez preparada la dieta, se le agregó el extracto disuelto en solución amortiguadora a pH 7 y se mezcló en una licuadora. De igual forma se preparó el estándar HD-1S-1980 para usarse como punto de referencia.

El efecto de la exposición de las larvas al extracto fue medida por la variable muerte; si las larvas tratadas retardaban su crecimiento o estaban moribundas pero se movían con un estímulo se consideraron vivas. Una vez preparada la dieta con el extracto incorporado, se colocaron 25 larvas neonatas o primer estadio en copas individuales por tratamiento bajo condiciones controladas: temperatura  $28^{\circ}\text{C}\pm 2$ , humedad relativa, 50-60 %; fotoperíodo de 12 h. Se determinó la mortalidad a los 7 días posteriores a la exposición, evaluándose en porcentaje de mortalidad.

#### **Determinación de la presencia de sapogeninas en el extracto de guishe.**

La determinación de estos compuestos se realizó por medio de cromatografía líquida de alta presión (HPLC), espectrografía infrarroja y ultravioleta, y resonancia magnética nuclear. Para tal efecto se pidió la colaboración del Departamento de Farmacia de la Universidad de Arizona en Tucson, Estados Unidos.

#### **Desarrollo de la Formulación.**

**Cepa de Microorganismo.** La cepa de *B. thuringiensis* serovar aizawai GM-10 se obtuvo de la colección internacional del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. La bacteria fue propagada en un medio basal hasta la formación del cuerpo paraesporal o toxina. Posteriormente se hizo una extracción mediante coprecipitación con lactosa-acetona (46). De la manera mencionada previamente.

**Insecto Blanco.** Los bioensayos se hicieron con larvas del primer estadio del insecto *S. frugiperda* obtenido del Laboratorio de Biotecnología de la Unidad regional Universitaria de Zonas Áridas de la Universidad Autónoma Chapingo. El insecto fue reproducido con la dieta ya mencionada.

**Coadyuvante.** Como coadyuvante se utilizó el extracto alcohólico del guishe seco y molido a una concentración de 100  $\mu\text{g/g}$  de formulado.

**Material encapsulante.** Se utilizó harina de maíz nixtamalizada con alto contenido de almidón (del 80 a 90%). Para la polimerización en frío se modificó el método de McGuire y Shasha (14). Se adicionaron 10 ml de alcohol isopropílico a 100 g de harina de maíz pregelatinizada, se dejó reposar la masa durante 30 min y se pasó la pasta formada por una tamiz de malla 20. El formaldehído fué adicionado a la mezcla en concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 % (v/p).

**Fagoestimulante.** Como fagoestimulante se utilizó el aceite vegetal crudo de algodón (Ac) y aceite vegetal de maíz comercial (Am). Para probar cual de los dos producía un efecto de estimulación del apetito, se montó un experimento para estimar el porcentaje de preferencia. Así, se colocaron 10 microcápsulas conteniendo uno de los aceites en 10 cajas petri, cada una de las cuales se dividió en cuatro secciones o áreas; en dos de estas se colocaron las cápsulas con el fagoestimulante y en una se colocaron cápsulas sin fagoestimulantes. Posteriormente, en la sección libre se inocularon 10 larvas neonatas de *S. frugiperda*, y se observó el desplazamiento de las larvas hacia cada sección y se contaron el número de larvas que ingirieron el alimento sin cambiar de sección. Al número resultante se le denominó porcentaje de preferencia.

**Protectores de luz solar.** se probaron tres protectores de luz solar: el rojo congo (Rc), el verde de malaquita (Vm) y el carbón vegetal (Cv), todos a una concentración de 0.05 %. De acuerdo a esto se hicieron tres grupos de formulados y se expusieron por 4, 8, 16, 24, 32, 48, 96 h a una lampara de rayos UV en un cuarto oscuro. Posteriormente se efectuó un bioensayo con larvas neonatas de *S. frugiperda* y se determinó porcentaje de sobrevivencia colocando aproximadamente 100 gránulos del formulado en una caja petri, las microcapsulas fueron humedecidas con agua y se dejaron reposar durante 4 horas hasta que visualmente no se apreció exceso de humedad, entonces se colocaron 10 larvas y se dejaron comer *ad libitum* durante 24 h, después esas fueron colocadas individualmente en recipientes de plástico conteniendo dieta normal. Al transcurrir 7 días , se contaron el número de larvas vivas, y con ello se obtuvo el porcentaje de sobrevivencia.

**Procedimiento de Formulación.** Para preparar los microcapsulas cada mezcla se hizo con la harina de maíz incorporando el ingrediente activo a razón de 3% (p/p) (60% de espasa-inclusión y

40 % de extracto de guishe), isopropanol al 10% (v/p), aceite vegetal al 0.5 % (v/p) y agua destilada al 10% (v/p), y protector de luz solar al 0.05 % (p/p). La mezcla se dejó reposar durante 2, 4, 8, 16 y 24 h a la temperatura ambiente en una bolsa de plástico y posteriormente se pasó por un tamiz de malla 20. Cada tratamiento se pesó antes y después de la operación y se determinó el porcentaje de humedad residual en la microcápsula por el método gravimétrico.

**Persistencia en el Ambiente del Formulador.** Cada uno de los formulados fue colocado con un aplicador manual de granulados en el cogollo de plantas de maíz en la temporada de lluvia, durante este ensayo se presentaron 3 días de lluvia intermitente, al término de los cuales se determinó la permanencia de las microcapsulas haciéndose una apreciación visual para no destruir las hojas de la planta.

**Análisis de la Estructura del Formulador.** Con el objeto de conocer la estructura de la microcápsula, se hicieron observaciones en el microscopio estereoscópico de luz de 40X y en el microscopio electrónico de barrido de las microcapsulas, y verificar si estas presentaban redes matriciales.

### **Prueba en Campo.**

#### **Descripción del Area de Estudio.**

*Localización geográfica:* Este trabajo se realizó en una parcela de un productor en la granja Esther sita en Noé, Dgo. Municipio de Gómez Palacio, Dgo. Localizado cartográficamente aproximadamente en el paralelo 25° 52' 54" de latitud norte y en el meridiano 103° 54' 37" de longitud oeste, con una altitud aproximada de 1130 msnm. (SARH), el cual presenta las siguientes características:

*Clima:* de acuerdo con el sistema de clasificación de Kopen modificado por García (1973), corresponde a un BWhw" (e) que indica un clima muy seco con lluvias en verano y porcentaje de precipitación pluvial en invierno entre 5 y 10 mm.

*Temperatura:* La temperatura promedio en los últimos 20 años es de 20.3 °C y un mínimo de 5.7 °C (SARH, 1994), los meses más calurosos son de mayo a agosto con una temperatura promedio de 23 °C y los más fríos son en diciembre y enero con una temperatura promedio de 15 °C.

*Precipitación pluvial:* El promedio aproximado en los últimos 20 años es de 240 mm, fluctuando entre 160 mm. en años secos, hasta 430 mm. en años húmedos, los meses más lluviosos son en junio con 54 mm., julio con 125 mm., agosto con 46 mm. y septiembre con 36 mm.

*Humedad relativa:* La humedad relativa varía de acuerdo con las estaciones del año, encontrándose para cada una los valores porcentuales siguientes: primavera 32, verano 45, otoño 52 e invierno 45.

*Suelos:* Los suelos predominantes en el área son de origen aluvial predominando los xerosoles cálcicos y lúvicos, así como yermosoles de igual tipo, los cuales son característicos de las zonas áridas y semiáridas. Estos presentan más de 100 cm de profundidad que muestran horizontes A-ocríco y B-argílico bien definidos, con estructura moderadamente desarrollada en forma de bloques y bloques subangulares; presenta además, buen drenaje interno, considerándose ligeramente salinos con una conductividad eléctrica de 2.0 msiems y un pH de 7.9. el contenido de materia orgánica es 0.8 % y su capacidad de intercambio catiónico total es de 12.8 meq/100 g de suelo.

*Agua para riego:* El agua que se utilizó fue la del pozo profundo que se encuentra en dicha localidad cuyas características son de agua de buena calidad para el riego.

*Semilla de maíz:* En la realización del presente trabajo se utilizó el híbrido de maíz H-507, el cual fue adquirido en la Productora Nacional de Semillas (PRONASE).

### **Procedimiento Experimental.**

*Diseño de tratamientos y experimental:* el diseño de tratamientos fue un factorial de 3 x 2 x 2 = 3 protectores solares x 2 niveles de guishe (0 y 100 µg/ml) x 2 niveles de aceite comestible (0 y 0.05 % p/p) y dos testigos (testigo sin protector, sin aceite y sin guishe, y un testigo absoluto), dando un total de 14 tratamientos que se muestran en la tabla 2, en un diseño experimental de bloques al azar, con cuatro repeticiones.

Tabla N° 2. Relación de tratamientos de tres factores:  
protectores de luz solar, coadyuvante y atrayente.  
como componentes del formulado.

Tratamiento	Protector	Guishe	Maíz
1	CA	G	A
2	CA	G	N
3	CA	S	A
4	CA	S	N
5	VM	G	A
6	VM	G	N
7	VM	S	A
8	VM	S	N
9	RC	G	A
10	RC	G	N
11	RC	S	A
12	RC	S	N
13	TS		
14	TA		

En donde:

CA es carbón vegetal

VM es verde de malaquita

RC es rojo congo

G es con guishe

S es sin guishe

A es con aceite de maíz

N es sin aceite de maíz.

TS es el testigo sin guishe y sin aceite de maíz

TA es el testigo absoluto.

*Tamaño de la unidad experimental:* El tamaño de la parcela fué de 5 hileras con una distancia entre hileras de 90 cm. y una longitud de 10 m., la parcela útil fue de 3 hileras centrales con una

longitud de 6 m. dejando 2 m. al principio y al final para evitar efectos de orilla. En total el tamaño fué de 16.2 m<sup>2</sup>.

*Establecimiento del experimento:* El barbecho se realizó durante enero de 1993, se niveló el terreno con una escrepa y se surcó a 90 cm entre cada uno de ellos, se dió un riego de presiembra el 15 de abril de 1993 y se procedió a sembrar el 27 de ese mismo mes con una sembradora en tractor. Después de emergidas las plantulas, se hizo un aclareo dejando una distancia entre plantas de 25 cm y al mismo tiempo se hizo una escarda para romper la costra formada, se realizaron dos deshierbes manuales con azadón para eliminar malezas.

*Cosecha:* Una vez que las plantas estuvieron suficientemente maduras y secas el 29 de julio, se procedió a cosecharlas manualmente. Las plantas cosechadas se introdujeron en costales previamente etiquetados por tratamiento. Posteriormente a la cosecha se dejaron secar al aire para proceder al desgrane y limpieza manual del grano. El contenido de humedad del grano al pesarse fue de 2.5 %.

*Rendimiento por parcela:* conforme se determinó el peso por parcela útil y se hizo la transformación en kilogramos por hectárea para su análisis correspondiente.

### **Análisis Estadístico.**

Los resultados de ensayos, fueron sometidos a un análisis de varianza con el procedimiento ANOVA del paquete computacional SAS (149), y prueba de rango múltiple de Duncan.

## **RESULTADOS**

### **Fitotoxicidad de los extractos del guishe.**

La adición de extractos de guishe a las plantas analizadas no produjo un efecto significativo ( $P > F 0.05$ ) sobre el rendimiento en peso seco (g) de estas últimas (tabla 3), indicando que esos compuestos no mostraron tener efectos alelopáticos o fitotóxicos.



Tabla No. 3. Efecto de extractos de guishe sobre el peso de *Gossypium hirsutum* L. G., *Lactuca sativa* D. L. , y *Solanum tuberosum* L. G.

TIPO DE PLANTA	TIPO DE EXTRACCION	Concentracion %			
		3	1.5	0.75	0.3
ALGODON	ACUOSA	0.454a*	0.523a	0.516a	0.573a
	ALCOHOLICA	0.534a	0.484a	0.519a	0.393a
	ACIDA	0.479a	0.566a	0.478a	0.497a
	ALCALINA	0.434a	0.540a	0.482a	0.536a
	CONTROL	0.540a	CV=19.3	DMS=0.217	
LECHUGA	ACUOSA	3.904a	4.834a	3.760a	4.173a
	ALCOHOLICA	3.821a	4.731a	3.247a	4.044a
	ACIDA	3.543a	4.060a	4.299a	3.468a
	ALCALINA	4.751a	4.385a	4.445a	3.823a
	CONTROL	3.409a	CV=25.69	DMS=2.333	
PAPA	ACUOSA	7.743a	8.322a	7.615a	7.443a
	ALCOHOLICA	5.895a	8.653a	8.410a	8.854a
	ACIDA	7.736a	8.373a	7.424a	7.216a
	ALCALINA	8.435a	7.346a	7.043a	8.111a
	CONTROL	7.885a	CV=17.57	DMS=3.055	

\*: Agrupación de Duncan, letras iguales son estadísticamente similares.

#### - Actividad de *B. thuringiensis* cepa GM-10 contra *S. frugiperda*.

En los resultados del ensayo de la actividad de la toxina de este microorganismo contra *S. frugiperda*, se observó que el tratamiento que mostró una mayor mortalidad fué el de 500 µg de la mezcla de esporas-inclusiones, donde se obtuvo un 100 % de mortalidad del insecto a un nivel de  $P > F 0.01$ , con un aceptable coeficiente de variación de 8.3 % (tabla 4).

Para determinar la dosis letal de la bacteria se realizó una prueba de bondad de ajuste entre la probabilidad de mortalidad en porciento contra dosis (análisis Probit), utilizando para este fin el paquete computacional SAS, los resultados obtenidos se muestran en la tabla N° 5 , en donde, se observa que la  $DL_{50}$  corresponde a 83.71 µg/ml, en tanto que la  $DL_{90}$  corresponde a 300 µg/ml.

Tabla 4 . Actividad de la cepa GM-10 de *B. thuringiensis*, contra *S. frugiperda*. en porcentaje de mortalidad.

Dosis µg/ml	Rep. I	Rep. II	Rep. III	Media	Agrup. Duncan
500	98	100	100	93.3	A
250	73	82	87	80.6	B
100	50	65	60	58.3	C
50	30	28	36	31.3	D
0	0	0	0	0	E

Letras iguales son estadísticamente similares.

**Actividad de *B. thuringiensis* cepa GM-10 más extracto de guishe contra *S. frugiperda*:**

El extracto del guishe por si solo mostró una actividad insecticida del 20 % de mortalidad contra el insecto blanco (tabla 6), sin embargo, al adicionarlo al complejo espora-inclusión de *B. thuringiensis*, se demostró un marcado efecto sinérgico como se puede apreciar en la misma tabla.

Con los resultados anteriores se determinaron las dosis letales, mediante un análisis probit. Los resultados obtenidos de este procedimiento se encuentran en la tabla N° 7. en el se observa que el valor de la LD<sub>50</sub> corresponde a 140 µg/ml, en tanto que el valor de la LD<sub>90</sub> es de 236 µg/ml.

Tabla N° 5. Valores de probabilidad de mortalidad de *B. thuringiensis* cepa GM-10, contra *S. frugiperda* con límites de confianza al 95% .

PROBABILIDAD DE MORTALIDAD	DOSIS $\mu\text{g/ml}$	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR
0.01	8.23	0.01	26.23
0.05	16.23	0.15	40.12
0.1	23.32	0.51	50.74
0.2	36.17	2.1	68.51
0.3	49.62	5.7	86.99
0.4	65.03	12.93	110.16
0.5	83.71	26.32	145.21
0.6	107.78	48.27	212.38
0.7	141.22	78.16	376.93
0.8	193.77	114.48	885.25
0.9	300.47	167.04	3,366

Tabla N 6. Actividad de *B. thuringiensis* cepa GM-10 mas extracto alcohólico de guishe contra *S. frugiperda*.

$\mu\text{g/ml}$ Bt	$\mu\text{g/ml}$ Guishe	Rep I	Rep II	Rep III	Media Trat	Agrup. Duncan
500	100	100	100	100	100	A
250	100	100	100	100	100	A
100	100	78	90	60	76	AB
50	100	45	60	72	59	B
0	100	20	27	15	20	C
0	0	0	0	0	0	D

letras iguales son estadísticamente similares

Tabla N° 7. Valores de probabilidad de mortalidad para la mezcla del complejo espora-inclusión de *B. thuringiensis* más el extracto alcohólico de guishe contra *S. frugiperda*.

Probabilidad de mortalidad	Límites de confianza al 95%		
	Dosis	Bajo	Superior
0.01	54.5	18.4	78.8
0.05	71.9	32.1	95.6
0.10	83.4	43.1	106.2
0.20	99.7	61.2	121.5
0.30	113.5	78.1	135.0
0.40	126.7	95.2	149.3
0.50	140.5	112.5	166.9
0.60	155.7	130.0	191.0
0.70	173.9	147.4	226.9
0.80	197.8	166.5	284.9
0.90	236.6	192.4	400.2
0.99	361.9	261.2	930.8

#### Ingredientes del formulado.

a). **Material encapsulante.** Se analizaron la harina de maíz pregelatinizada (Mp), harina de maíz cruda (Mc) y harina de maíz nixtamalizada (Mn), se observó que la harina de maíz crudo no se gelatinizaba en frío al agregar el isopropanol, la harina de maíz pregelatinizado (tipo maizena) si formó una masa moldeable pero al secar formó cápsulas muy duras, difícil de humedecer y no tenían adherencia sobre la superficie de hojas vegetales; mientras que, la harina de maíz nixtamalizado, formó microcápsulas que fueron fácilmente moldeables, adherentes e higroscópicas. Los resultados del porcentaje de humedad residual en las microcápsulas en función del tiempo de secado y la relación de formaldehído y tipo de secado se encuentran en la tabla N° 8. En él se puede observar que después de 24 h el porcentaje de pérdida de humedad es de 57 %, es decir que se tiene 43 % de humedad residual a 24 horas después de elaboradas las cápsulas.

Tabla N° 8. Prueba de Rango Múltiple, agrupación de Duncan en la variable tiempo de secado de las microcápsulas, en relación con el porcentaje de pérdida de humedad.

Agrupación de Duncan	Medias % de humedad	N	TIEMPO horas
A	57.226	16	24
A	54.788	16	16
B	42.808	16	8
B	42.053	16	4

Medias con la misma letra son estadísticamente similares.

De acuerdo con los resultados del análisis de varianza, se puede observar que existen dos grupos de porcentaje de pérdida de humedad, correspondientes al grupo A: 24 h con 57.2 % de pérdida de humedad y 16 h con 54.7 % ; y el grupo B: de 8 h con 42.8 % y 4 h con 42.0 % ..

En cuanto a la forma del secado, entre el tratamiento al aire y en la estufa, no se mostraron diferencias significativas  $P(= 0.98)$ . En cuanto al porcentaje de formaldehído utilizado como endurecedor de la microcápsula mostró ser significativo  $P(=0.029)$ , lo que indica que es posible utilizar el nivel más bajo de 0.1 % (v/p) de este reactivo.

i). **Ensayo de Fagoestimulante.** Los resultados del ensayo con aceite de maíz como fagoestimulante se encuentran en la tabla N° 9, en donde se puede apreciar que en base a la preferencia por el aceite de maíz crudo (Ac) Mediante la prueba de  $X^2$  se probó la hipótesis de preferencia por Ac. En este caso  $X^2_{o} = 12.542$  y  $X^2(0.05, 2) = 5.9915$ , se rechaza la hipótesis de preferencia por Ac de que  $P_i = 0.59$  y se infiere que el experimento no es concluyente

c). **Protectores de Luz solar.** Se probaron los colorantes verde de malaquita (Vm), rojo congo (Rc) y carbón vegetal (Cv), cuyo resultado del ensayo con éstos, se encuentran en las tablas N° 10, y 11.

c). **Protectores de Luz solar.** Se probaron los colorantes verde de malaquita (Vm), rojo congo (Rc) y carbón vegetal (Cv), cuyo resultado del ensayo con éstos, se encuentran en las tablas N° 10, y 11.

Tabla N° 9. Fagoestimulación con dos aceites comestibles, sobre la preferencia hacia uno de ellos, con larvas neonatas de *S. frugiperda*

Tratamientos	Repeticiones			
	I	II	III	IV
Aceite crudo	78	56	40	62
Aceite de maíz	22	44	60	38

Tabla N° 10. Prueba de rango múltiple. Agrupación de Duncan de la variable por ciento de actividad, para cada tipo de protector solar.

Agrupación de Duncan	Media	N	PROT
A	78.429	21	Vm
B	70.286	21	Rc
C	45.857	21	Cv

Medias con la misma letra son estadísticamente similares

c). **Protectores de Luz solar.** Se probaron los colorantes verde de malaquita (Vm), rojo congo (Rc) y carbón vegetal (Cv), cuyo resultado del ensayo con éstos, se encuentran en las tablas N° 10, y 11.

Tabla N° 11. Prueba de rango múltiple de la variable tiempo de exposición a los rayos UV. contra porcentaje de sobrevivencia de larvas neonatas de *S. frugiperda*

Agrupación de Duncan	Media % de sobv.	N	TIEMPO horas
A	100.00	9	0
A	96.22	9	4
B	85.22	9	8
C	71.55	9	16
D	59.00	9	24
E	51.00	9	32
F	46.77	9	48
F	44.22	9	96

Medias con la misma letra son estadísticamente similares.

d). **Ensayo de Persistencia en el Medio Ambiente.** Las microcápsulas humedecidas pudieron permanecer en el portaobjetos invertido hasta por un período mayor de 12 días lo que indica que el formulado tenía propiedades adhesivas aceptables con la finalidad de ser utilizado en superficies no rugosas.

Al colocar el formulado en el cogollo de la planta, y permanecer durante tres días de lluvia intermitente, se pudo apreciar que hay una pequeña pérdida del material, aunque éste por ser muy pequeño (no mayor del 15 %), no representó una cantidad significativa, lo cual indica que sus propiedades adherentes en la superficie foliar del cultivo de maíz es bastante aceptable.

e) **Estructura de las Microcápsulas:** Estas estructuras formaron redes matriciales, con una superficie irregular característica de una masa gelatinizada. En observaciones al microscopio electrónico de barrido se demostró que las microcápsulas poseían poros y que las inclusiones de *B. thuringiensis* quedaban atrapadas en el interior (Fig. 2 - 6).

f) **Presencia de sapogeninas en el extracto de guishe:** Se demostró la presencia de estos compuestos en el extracto alcohólico. El análisis de la estructura química reveló una familia de sapogeninas esteroidales que correspondió a la de la esmilagienina (Fig. 7.)

#### **PRUEBA EN CAMPO.**

De acuerdo con el resultado del análisis de varianza de la variable dependiente población larvaria de *S. frugiperda*, después de la aplicación del bioinsectida, se muestra una diferencia altamente significativa de los tratamientos  $Pr > 0.0001$ ,

Fué necesario hacer un ajuste por mínimos cuadrados entre la población inicial y la final del insecto blanco debido a que bajo condiciones naturales en el campo, existe la probabilidad de encontrar valores muy diferentes aún en plantas contiguas, además de que los hábitos caníbales del gusano cogollero, hacen más difícil de interpretar los datos obtenidos in situ. En la tabla N° 12 se muestran los valores ajustados de antes (X) y después (Y) de la aplicación de los diferentes formulados del bioinsecticida, en ella podemos observar que el valor más bajo de la población ajustada correspondió a 17.25 larvas por tratamiento (lv/tr) antes de la aplicación AA y para después de la aplicación DA del mismo tratamiento correspondió a 1.75 lv/tr, mientras que para la población mas grande fué de 34.75 lv/tr AA y 5.25 lv/tr DA; en tanto que el testigo tuvo 19.25 lv/tr AA y 14.5 DA, lo que da una clara muestra del efecto de la aplicación del bioinsecticida sobre las poblaciones de *S. frugiperda* en el cultivo del maíz.



Tabla N 12. Valores ajustados por el método de mínimos cuadrados, de las poblaciones larvarias de *S. frugiperda* antes y después de aplicado el bioinsectida.

TRAT	Después		Antes	
	Media	DS	Media	DS
1	9.2	7.3	21.5	12.7
2	8.5	2.3	20.0	8.1
3	4.0	2.7	18.2	8.0
4	3.7	1.7	20.7	3.2
5	4.0	1.6	27.2	12.8
6	2.2	0.5	30.0	22.3
7	1.7	0.5	17.2	4.5
8	5.2	2.2	34.7	13.7
9	2.0	1.4	21.7	10.2
10	3.5	2.3	21.2	14.9
11	3.7	1.5	34.5	17.5
12	3.5	1.7	22.0	9.3
13	4.5	2.3	26.5	9.4
14	14.5	4.5	19.2	11.2

De acuerdo con la tabla N 13. donde se muestran el efecto en el rendimiento en grano de maíz, por la aplicación de diferentes formulados, se aprecia que el valor superior del rendimiento con una media de 3211.8 kg/ha correspondió al tratamiento CAGN, es decir aquel que contiene como protector solar el carbón vegetal, el extracto alcohólico de guishe y sin el aceite de maíz comestible como atrayente, en tanto que el valor más bajo correspondió al testigo absoluto TA con un valor medio de 1083.2 kg/ha. Los valores obtenidos en campo fueron sometido a un análisis de varianza de la aportación por grupo a la suma de cuadrados, que muestra que no hubo diferencias significativas entre bloques, mientras que si mostró diferencias altamente significativas  $P > 0.0001$  entre tratamientos, los cuales en prueba de rango múltiple de Duncan, mostró la agrupación que se encuentra en la tabla N° 14, en ella se aprecian tres grupos de medias desde 3211.8 kg/ha hasta 2440 kg/ha, el segundo grupo lo constituye la media del tratamiento CASN, es decir aquel que tiene carbón vegetal como protector, sin guishe y sin atrayente; el tercer grupo es el la media del testigo absoluto correspondiente a 1083.2 kg/ha. Los tratamientos CAGN, RCGA, VMSA, CAGA, CAGA, CASA, RCSA, VMSN, superaron al testigo con el tratamiento

correspondiente a TS es decir aquel que tenía la toxina de *B. thuringiensis*, pero que no contenía protector solar, extracto alcohólico de guishe, ni aceite vegetal como atrayente. El testigo absoluto, con un valor medio de 1083.2 kg/ha, fué superado por los tratamientos. Aparentemente no hay efecto de los protectores ni del atrayente, sin embargo de acuerdo con el análisis de varianza del factorial en prueba, según se muestra en el cuadro N° 15 se encontró significancia en el factor Atrayente con un  $Pr > 0.0409$ , mientras que para Protector solar x Coadyuvante es de  $Pr > 0.0032$ .

Tabla N° 13. Efecto de la aplicación de la aplicación de diferentes formulados de bioinsecticida sobre el rendimiento de maíz en Kg/ha.

Tratamiento	Repeticiones				
	I	II	III	IV	
CAG A		2243	2810	3780	2806
CAG N		3215	2880	3648	3104
CASA	3014	2640	2870	3190	
CASN		2580	1670	2727	2160
VMGA		2338	1962	3096	2364
VMGN		2390	2604	2240	2783
VM SA		2670	3335	3216	2940
VM SN		3282	2940	2656	2286
RCGA		3085	3484	3260	3016
RCGN		2770	2787	2770	2670
RC SA		2487	3421	2849	2930
RC SN		2590	2739	2390	2770
TS		2996	2645	2770	2840
TA		1905	672	960	796

Tabla N° 14. Prueba de Rango Múltiple y agrupación de Duncan del efecto en el rendimiento de maíz debido a la aplicación de diferentes formulados de bioinsecticida.

Agrupación de Duncan	Media	TRAT
A	3211.8	CAGN
A	3211.3	RCGA
BA	3040.3	VMSA
BA	2959.8	CAGA
BA	2928.5	CASA
BA	2921.8	RCSA
BAC	2791.0	VMSN
BAC	2767.8	TS
BAC	2749.3	RCGN
BAC	2622.3	RCSN
B C	2504.3	VMGN
B C	2440.0	VMGA
C	2284.3	CASN
D	1083.2	TA

alfa = 0.05 GL= 39 CME= 133147.2

Tabla N 15. Aportación a la suma de cuadrados de los factores Protector (PROT), Caodyuvante (COAD), atrayente (ATRA) e interacciones de primer orden.

Fuente	GL	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	F Calc	Pr > F
REP	3	382327.729	127442.576	0.96	0.4215
PROT	2	305492.542	152746.271	1.15	0.3274
COAD	1	79462.6870	79462.687	0.60	0.4439
ATRA	1	597417.187	597417.187	4.51	0.0409
PROT*COAD	2	1799980.12	899990.062	6.79	0.0032
PROT*ATRA	2	170550.125	85275.062	0.64	0.5315
COAD*ATRA	1	365577.521	365577.521	2.76	0.1056

## DISCUSION

Los resultados del experimento para determinar si la aplicación de extractos de guishe podían presentar efectos alelopáticos o fitotóxicos, nos indicó que no se aprecia efecto en el rendimiento en masa seca a una  $P > F$  de 0.5 sobre plantas de algodónero, lechuga y papa. Por lo que se puede inferir que la adición de esos extractos no mostraron tener efectos alelopáticos o fitotóxicos en ninguno de las plantas estudiadas. Hay que aclarar, que el hecho de que no se encontrara alelopatía con los extractos no indica de ninguna manera que ésta se pueda presentar cuando alguna de las plantas blanco se encuentre cohabitando con el *A. lechuguilla* en condiciones naturales.

La dosis de espора-inclusión de *B. thuringiensis* que mostró una mayor mortalidad contra *S. frugiperda* fué el de 500  $\mu\text{g}$ , a un nivel de  $P > F$  0.01, con un aceptable coeficiente de variación de 8.3 % . La  $DL_{50}$  obtenida por análisis probit en el paquete SAS correspondió a 83.71  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con un intervalo de confianza de 26.3 - 145.21  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ; en tanto que la  $DL_{90}$  fué de 300  $\mu\text{g}/\text{ml}$  con un intervalo de confianza de 167.0 - 3366  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , esta última estimación queda fuera del rango de estudio, por lo que puede dar origen a errores de sobrestimación en cuanto a tomar esta dosis para posibles usos en aplicaciones en campo, ya que el factor de heterogeneidad estimado fue  $H=8.12$ , el cual se considera aceptable en los límites superiores, es posible que este valor se debiera a factores de manejo tanto de la espора-inclusión como a la dilución en la dieta y más aún a factores escondidos de variabilidad genética del insecto blanco.

De acuerdo con el efecto de la mezcla del complejo espора-inclusión de *B. thuringiensis* más el extracto alcohólico de guishe contra *S. frugiperda* se puede inferir que el extracto del guishe no parece tener gran actividad (alrededor del 20 % de mortalidad), pero adicionado al complejo espора-inclusión de *B. thuringiensis*, éste tiene un efecto sinérgico que debe ser estudiado cuidadosamente con otras cepas y otros insectos. La  $DL_{50}$  correspondió a 140  $\mu\text{g}/\text{ml}$  del complejo espора-inclusión con extracto alcohólico de guishe, a una proporción de 100  $\mu\text{g}$  de espора-inclusión + 100  $\mu\text{g}$  del extracto alcohólico del guishe con un intervalo de confianza de 112.58 a 166.97  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la mezcla espора-inclusión + extracto de guishe, en cuanto a la  $DL_{90}$  estimada por análisis probit a 236.61 con un intervalo de confianza de 192.43 a 400.25  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de

la mezcla mencionada arriba. En cuanto al factor de heterogenidad éste fué estimado en  $H=4.48$ , valor que nos indica que no hubo factores externos que influyeran en los datos estimados por este tipo de análisis, además de que los valores estimados no quedan fuera del rango de estudio, lo que nos da seguridad en cuanto a posibles usos en ensayos en campo.

Estudios realizados con otra sapogenina (la diosgenina) muestran que ésta actúa como fagoestimulante, aunque tanto la diosgenina como la sapogenina del guishe (esmilagenina) son de estructura esteroideal, cabe la posibilidad de que los mecanismos de acción en insecto sean diferentes, ya que no se menciona que la diosgenina tenga efectos sinérgicos.

Una observación adicional fue de que el extracto alcohólico de guishe parece tener una fuerte adhesividad sobre la superficie foliar de los cultivos estudiados, ya que se encontraron residuos de éste en la superficie foliar después de 10 días de haber sido aplicado.

La confirmación de la estructura química de este compuesto, muestra que se trata de una familia de sapogeninas con propiedades detergentes, lo que le confiere la propiedad de disminuir la tensión superficial y con ello, al estar en el formulado, permite tener una mayor adherencia a la superficie foliar de los cultivos.

Algunos extractos de plantas ensayados que han sido analizados para encontrar actividad insecticida contra plagas agrícolas han sido utilizados como agentes sinérgicos, más que como agentes de control, aún cuando éstos hayan mostrado tener este tipo de actividad (54,67,131); en el caso del extracto alcohólico del guishe, nosotros consideramos que por las propiedades de superficie que éste pueda tener, debe ser utilizado más como coadyuvante que como insecticida.

Como material encapsulante de los tres materiales probados maíz pregelatinizado Mp, maíz crudo y molido Mc y maíz nixtamalizado Mn, se observó que la harina de maíz cruda no se gelatiniza al agregar isopropanol, ya que no forma una masa moldeable; es posible que la falta de un tratamiento con álcali y la cocción influyan directamente sobre la formación del material gelatinizado y los cambios fisicoquímicos que este procedimiento involucra, como la alteración de las moléculas primarias en almidón pregelatinizado y algunas modificaciones en los aminoácidos que le dan probabilidades de enrejados anisótropos (13,34,35,90,104,120).

Por otra parte la harina de maíz pregelatinizado (tipo maizena) si forma una masa gelatinizable pero al secar forma cápsulas muy duras, difícil de humedecer y no tienen adherencia sobre la superficie de hojas vegetales.

En tanto que, la harina de maíz nixtamalizada forma microcápsulas las que son fácilmente moldeables, adherentes e higroscópicas, esta propiedad se debe a la pregelatinización de los almidones y proteínas del maíz y a su proceso de hidrólisis alcalina.

El ensayo en portaobjetos indicó que las microcápsulas tienen adherencia a la superficie del portaobjetos, cuando este último se encuentra humedecido con agua, el ensayo en hojas de maíz mostró la misma característica. Una observación hecha en microscopio estereoscópico nos mostró que la microcápsula sufre una alteración en su forma, ya que la superficie de la cápsula en contacto con el portaobjetos adopta la forma de esta última. Por otra parte, las microcápsulas no se solubilizan en agua, aunque hay que aducir, que ésta pudiera presentarse en forma coloidal.

En cuanto a las observaciones de las cápsulas hechas en microscopio electrónico de barrido, nos indicó que el grado de reticulación no fué muy alto, ya que se forman poros que permiten la difusión de líquidos o gases con el exterior de la cápsula, ésto tiene importancia, ya que a medida que aumenta la reticulación la solvatación es insuficiente (112). Por tal motivo, en lo sucesivo se utilizó únicamente en la formulación harina de maíz nixtamalizada (Mn).

Una vez seleccionada la harina de maíz nixtamalizada las pruebas efectuadas con ella nos permitió efectuar algunas pruebas adicionales como la de la pérdida de humedad en función del tiempo, los resultados del análisis de varianza nos indican que existen dos grupos de porcentaje de humedad, correspondientes al grupo A: 24 h con 57.2 % de pérdida de humedad y 16 h con 54.7 %; y el grupo B: de 8 h con 42.8 % y 4 h con 42.0 % , ésto indica que la cápsula tiene la propiedad de aumentar hasta el doble de su peso en base seca y por tener el espacio poroso suficiente para soportar la incorporación de un líquido en su interior.

En tanto que el nivel de formaldehído utilizado como endurecedor de la microcápsula y protector contra el ataque microbiológico a la cápsula para los niveles 0.1, 0.2, 0.4 y 0.8 mostró no ser significativo a un nivel de  $P > 0.01$ , lo que nos indica que es posible utilizar el nivel más bajo de formaldehído 0.1 % de este reactivo. El coeficiente de variación obtenido para

todo este experimento fue de 11 % , valor que podemos considerar aceptable por tratarse de un material heterogéneo y de tamaño variable.

De los resultados del ensayo con aceite de maíz como fagoestimulante se puede apreciar que en base a la preferencia por el aceite de maíz crudo (Ac), la proporción estimada por Ac se estima en cada repetición mediante 0.78, 0.56, 0.40 y 0.62. El promedio aritmético de estos valores es 0.59. Mediante la prueba de  $X^2$  se puede probar la hipótesis de que la proporción de preferencia por Ac en cada repetición es  $P_i=0.59$  para  $i= 1, 2, 3, 4$ . En general la prueba establece que el criterio de rechazo de  $H_0$  con un nivel de significancia es : Rechazar  $H_0$  si  $X^2$  es igual o mayor que  $X^2_{\alpha}$ , gl. En este caso  $X^2_o= 12.542$  y  $X^2(0.05, 2)= 5.9915$ , se rechaza la hipótesis de preferencia por Ac de que  $P_i= 0.59$  para  $i=1,2,3,4$ . y se infiere que el experimento no es concluyente. Estos resultados no difieren de los encontrados por Bartelt y col en 1990, por lo que fué posible seleccionar para futuras formulaciones al aceite de maíz comercial Am, por ser éste de fácil obtención y de bajo precio en el mercado.

Hay que señalar que la adición de el extracto alcohólico de *A. lechuguilla* está formado por la sopogenina esmilagenina, la cual tiene estructura esteroidal, de la misma manera que la hordenina, lobelina y diosgenina, estas tres últimas tienen propiedades fagoestimulantes en diversas especies de insectos (17) y no sería nada remoto que la esmilagenina pudiera actuar de la misma forma.

En la selección de un compuesto cromógeno capaz de proteger a la toxina de *B. thuringienseis* de entre los compuestos que probamos se observa que existen diferencias altamente significativas entre tratamientos (protectores de luz solar) y entre el tiempo de exposición y % de sobrevivencia. En el primer caso el orden de importancia es Verde de Malaquita (Vm) con 78% de sobrevivencia en promedio, Rojo Congo (Rc) con 70 % de sobrevivencia en promedio y Carbón Vegetal (Cv) con 45 % de sobrevivencia en promedio.

En la selección de un bloqueador solar, pensamos que el verde de malaquita reúne las características apropiadas para el objetivo planteado, ya que este compuesto contiene electrones de valencia que pueden ser excitados a niveles de energía más altos, que desaparece a través de algunos de los diferentes procesos de relajación (12). Por otra parte la protección que recibe la espora por este compuesto, es posible que aumente su capacidad de resistencia en el medio

ambiente, ya que en la espora el daño ocasionado por la acción de la luz UV está relacionado directamente con la formación de dímeros de piridina, en nuestro estudio no encontramos indicios de que pudieran presentarse cambios genéticos visibles (3,12,70,80,134).

Después de la aplicación de los diferentes tratamientos del bioinsectida en la prueba de campo, se muestra una diferencia altamente significativa de los tratamientos  $P > 0.0001$ . Es necesario aclarar que se hizo un ajuste por mínimos cuadrados entre la población inicial y la final debido a que bajo condiciones naturales en el campo, existe la probabilidad de encontrar valores muy diferentes aún en plantas contiguas, además de que los hábitos caníbales del gusano cogollero, hacen más difícil de interpretar los datos obtenidos *in situ*.

De acuerdo con los resultados del rendimiento en grano de maíz, como un efecto de la aplicación de diferentes formulados, se aprecia que el valor superior del rendimiento con una media de 3211.8 kg/ha correspondió al tratamiento CAGN, es decir aquel que contiene como protector solar el carbón vegetal, el extracto alcohólico de guishe y sin el aceite de maíz comestible como atrayente, en tanto que el valor más bajo correspondió al testigo absoluto TA con un valor medio de 1083.2 kg/ha. lo que da una clara muestra del efecto de la aplicación del bioinsectida sobre las poblaciones de *S. frugiperda* en el cultivo del maíz.

Aparentemente no hay efecto de los protectores ni del atrayente, sin embargo de acuerdo con el análisis de varianza del factorial en prueba, muestra significancia en atrayente con un  $P > 0.0409$ , mientras que para protector solar x coadyuvante es de  $P > 0.0032$ , esto indica que el efecto en el rendimiento, a causa del combate del gusano cogollero fue más efectivo el aceite de maíz como cebo, en tanto que la interacción protector solar x coadyuvante aunque fueron inferiores al testigo sin protector y sin coadyuvante, muestra una sinergia positiva; por otro lado hay que resaltar que estos pertenecen a la misma agrupación de Duncan, por lo que entre ellos no hay diferencias significativas. De este experimento nosotros consideramos que aún cuando los resultados no sean del todo excluyentes, es posible hacer una discriminación de tratamientos de acuerdo a los datos obtenidos en pruebas de laboratorio e invernadero.

Por tal motivo el formulado realizado con extracto de guishe, el colorante verde de malaquita y la adición de aceite vegetal es una alternativa para el biocontrol del gusano cogollero *S. frugiperda*, por las siguientes observaciones hechas de esta discusión:



a). Existen varios factores importantes que favorecen la utilización de formulado a base de la *B. thuringiensis* serovar. *aizawi* GM-10, extracto de guishe y aceite vegetal en ellos se encuentran de que no tienen antecedentes de desarrollar resistencia en este insecto; b). la habilidad de la plaga para localizar a sus plantas hospederas, imposibilita hacer uso de enemigos naturales (153), por tal motivo es posible utilizar esta alternativa para un combate más efectivo (106); c). los datos de experimentos realizados con extractos de plantas contra *S. frugiperda* solo se han realizado a nivel de bioensayo y no son concluyentes (2, 55,144); y d). la estimación de que esta plaga reduce los rendimientos en 1,148 kg en parcelas con una densidad de 45,000 plantas por hectárea (7) y con la aplicación de este formulado es posible incrementar el rendimiento en 2,000 kg con respecto al control absoluto, ésto nos daría un incremento adicional de casi 800 kg/ha con respecto al uso de insecticidas químicos, además de los beneficios propios de los bioinsecticidas..

## CONCLUSIONES

En base al objetivo general de este trabajo de desarrollar un formulado altamente tóxico utilizando *Bacillus thuringiensis*, Aizawi, y extractos de *Agave lechuguilla* para el biocontrol de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz, de los resultados obtenidos en laboratorio, invernadero y campo; y la discusión de los mismos, se concluye lo siguiente:

1. La formulación de una mezcla de *B. thuringiensis* y extracto de guishe , mostró ser altamente efectiva para el control de *S. frugiperda* en el cultivo de maíz.
2. El uso del del extracto alcohólico del guishe mostró ser un magnífico coadyuvante, incrementando sinérgicamente la actividad tóxica del formulado de *B. thuringiensis* contra *S. frugiperda*.
3. Los extractos analizados de guishe carecieron de efectos fitotóxicos o alelopáticos en las plantas probadas.
4. La harina de maíz nixtamalizada es un material adecuado propio para encapsular los compuestos activos de este formulado de *B. thuringiensis*. , ya que se puede polimerizar en frío y forma redes matriciales; además de que permite la difusión de gases y líquidos y conserva un 10 % de humedad residual en el interior de las cápsulas que se elaboran con ella.
5. El compuesto cromógeno verde de malaquita es un magnífico protector contra la exposición a los rayos ultravioleta.
6. Es posible que el aceite vegetal influya como cebo del gusano cogollero aún cuando los resultados de laboratorio no hayan mostrado ser consistentes según el experimento de preferencia desarrollado.

## **PERSPECTIVAS SOBRE FUTURAS INVESTIGACIONES EN EL TEMA**

- 1.- Existen otros compuestos como el gossypol, o la misma esmilagenina extraída del guishe a los que se les debe determinar su actividad fagoestimulante.
- 2.- Es importante determinar la potencialidad de uso como material encapsulante de la grenetina, la quitina y otros compuestos similares.
- 3.- Otros compuestos como la dihidroxiacetona pudieran ofrecer alternativas como protector solar.
- 4.- El bioinsecticida desarrollado en este trabajo deberá probarse contra otras plagas de este y otros cultivos.
- 5.- La metodología para la fabricación del formulado podría ser usada para el encapsulamiento de otras toxinas o cepas de esta bacteria y de otras especies de microorganismos.

## LITERATURA CITADA

- 1.- Aizawai, K. 1971. Strain improvement and preservation of virulence of pathogens. En: Microbial control of insects and mites, Burges D. y H. Hussey (eds.), Academic Press, London. pp 655-672.
- 2.- Aldana, L., A. M. Menchaca, M. E. Valdes, S. Espin and F. García. 1993. Evaluación de plantas como fuente de principios activos sobre larvas de gusano cogollero del maíz "*Spodoptera frugiperda*" Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula Pue. Mex. pag 201.
- 3.- Ahmed, S. M., M. V. Nagamma and S. I. Majumdar. 1973. Studies on granular formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner. Pestic. Sci. **4**: 19-23.
- 4.- Angus, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature. **173**:545-546.
- 5.- Arévalo-Niño K., 1993. Toxinas de *B. thuringiensis*. en: Biotecnología para la Producción de Bioinsecticidas, ed por Galán-Wong, L. J. UNAM. 101 pgs.
- 6.- Aronson, A. I., W. Beckman, And P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. **50**: 1-24.
- 7.- Banda, T.J.F. 1981. Importancia económica de *Heliothis zea* y determinación del umbral económico. distribución matemática y muestreo de *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) en maíz criollo, Tesis de Doctor en Ciencias, I.T.E.S.M., División Ciencias Agropecuarias y Marítimas, Monterrey, N.L., México. pp 55-60.

- 8.- Barak, B., Zaritsky, A. and J. Margalit. 1988. The fate of *B. t.* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*) in the natural habitat. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis* Hubei. Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China. October 14-18.
- 9.- Bartelt, R. J., M. R. McGuire and D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the European Corn Borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to Starch Based Formulation for *Bacillus thuringiensis*. *Environ Entomol.* **19**: 182-189.
- 10.- Bauer, L.S. 1992. Response of the imported willow leaf beetle to *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on poplar and willow. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:330-331.
- 11.- Bauer, L.S. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cotton wood leaf beetle. *J. Invertebr. Pathol.* **59**:15-25.
- 12.- Bauman, R. P. 1972. Absorption Spectroscopy, John Wiley & Sons, New York.
- 13.- Bazua, C. D., R. Guerra and H. Sterner. 1979. Extruded Corn Flour as an Alternative to Lime-Heated Corn Flour for Tortilla Preparation. *Jour. of Food Sci.* **44**:940-941.
- 14.- Becker, N. 1990. Microbial control of mosquitos and black flies. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 84-89.
- 15.- Beer, Andrew. 1991. A model agent still waiting to take off? Agrow. PJB Publications Ltd. London. No. 141. August 16th. pp 22-24.

- 16.- Berliner, E. 1911. Über die Schlaffsucht der Mehlmottenraupe (*Ephestia kuehniella* Zell), und ihren Erreger *Bacillus thuringiensis*. Zeitschrift für angewandtes Entomology 2:29-56.
- 17.- Bernays, E. A., and R. F. Chapman, 1978. "Plant chemistry and acridoid feeding behaviour," in Biochemical Aspects of Plant and Animal Coevolution, ed. J.B. Harborne (London: Academic Press, pp. 99-141.
- 18.- Boharck, E. H. 1964. N-(DL-2-Amino-2-Carboxy Ethyl)-L-Lysine, a New Aminoacid Formed on Alkaline Treatment of Proteins. J. Biol. Chem. 239:2878-2883.
- 19.- Bowen, N. 1991. World agrochemical markets, PBJ Publication, Richmond, U.K. pp 115.
- 20.- Brownbridge, M. and J. Margalit. 1986. New *Bacillus thuringiensis* strains isolated in Israel are highly toxic to mosquito larvae. J. Invertebr. Pathol. 48:216-222.
- 21.- Bulla, L.A. Jr., D. B., Bechtel, K.J., Kramer, K.J., Shethna, Y.I, Aronson, A.I. y P.C. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit. Rev. Microbiol. Boca Raton, Florida. 8:147-204.
- 22.- Burgerjon, A. and H. T, Dulmage. 1977. Industrial and international standarization of microbial pesticides I. *B. thuringiensis*. Entomophaga. 22:121-29
- 23.- Burges, H.D., Thompson and Latchford. 1976. Importance of spores and delta-endotoxin protein crystals of *B. thuringiensis* in *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 27:87-94.

- 24.- Burges, H.D. 1986. Impact of *Bacillus thuringiensis* on pest control with emphasis on genetic manipulation. *J. Mircen.* **2**:101-120.
- 25.- Carlberg, G. 1973. Biological effects of the thermostable beta-exotoxin produced by different serotypes of *B. thuringiensis*. Academic Disertation for Public Criticism. Univ. of Helsinki.
- 26.- Carlton, B.C., C. Gawron-Burke., and T.B., Johnson. 1990. Exploiting the genetic diversity of *Bacillus thuringiensis* for the creation of new bioinsecticides. Abstracts of Vth Inter.Colloquium on Invertebrate Pathol. microb control. Adelaida, Australia. pp 18-22.
- 27.- Carter, L.J. 1976. Pest control: NAS panel warns of possible technological breakdown. *Science.* **91**:836-837.
- 28.- Couch, T.L. y R. Ross. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. and Bioeng.* **22**:1297.
- 29.- Cunningham, J.C. 1990. Use of microbials for control of defoliating pests of conifers. Abstracts of Vth International Colloquium on Invertebrate Pathology & Microbial Control. Adelaida, Australia. pp 164-168.
- 30.- Chambliss, O.L., and C. M. Jones, 1966. "Cucurbitacins: Specific insect attractants in Cucurbitaceae," *Science* **153** :1392-93.
- 31.- Cheung, P.Y.K., R.M., Roe., B.D., Hammock., C.L., Judson, C.L. and M.A. Montague. 1985. The apparent in vivo neuromuscular effects of the delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in mice and insects of four orders. *Pestic. Biochem. Physiol.* **23**:85.

- 32.- Chiang, A. S., D. F. Yen, and W. K. Peng. 1986. Germination and proliferation of *Bacillus thuringiensis* in the gut of rice moth larva, *Corcyra cephalonica*. J. Invert. Pathol. **48**: 96-99.
- 33.- Choma, C. T., and H. Kaplan. 1990. Folding and unfolding of the protoxin from *Bacillus thuringiensis*: evidence that the toxic moiety is present in an active conformation. Biochemistry **29**:10971-77.
- 34.- Collison, R. 1968. Swelling and Gelation of Starch, in: Starch and its Derivates. Ed. by Raddley, J.A. 1<sup>st</sup> Ed. Champan and Hall Ltd. London U.K.
- 35.- Chabot, J.F., L. F. Hood, and J. E. Allen. 1976. Effect of Chemical Modifications on the ultrastructure of corn, Waxy Maize and Tapioca Starches., Cereal Chem Vol **53**:85-91.
- 36.- Davidson, E.W. 1982. Bacteria for the control of arthropod vectors of human and animal disease. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 289.
- 37.- De Barjac, H. 1978. Une nouvelle veriete de *Bacillus thuringiensis* très toxique pour les moustiques: *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* sérotype 14. R. Acad. sc. Paris. T. 268, D: pp 797-800.
- 38.- De Barjac, H. and E. Frachon. 1990. Classification of *Bacillus thuringiensis* strains. Entomophaga. **35**:233-240.



- 39.- DeLucca, A. J., W. J. Connick, D. R. Fravel, J. A. Lewis and J. M. Bland. 1990. The use of bacterial alginates to prepare biocontrol formulations. *Jour. of Ind. Micro.* **6**:129-134.
- 40.- DeLucca, A. J., G. Simonson, and A. D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils in the United States. *Can. J. Microbiol.* **27**:865-870.
- 41.- De Lucca, A.J. II, J.G., Simonson, and A.D. Larson. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. *Can. J. Microbiol.* **27**:865-870.
- 42.- Dimock, M.B., R.M., Beach, and P.S. Carlton. 1989. Endophytic bacteria for delivery of crop protection agents. En: *Biotechnology, biopesticides and novel plant-pest resistance management*, Roberts D.W. y R.R. Granados (eds.), Boyce Thompson Institute for Plant Research, Ithaca, New York, N.Y. pp 88-92.
- 43.- Dixon, B. 1991. *Bacillus thuringiensis* toxins studied. *Bio/Technology.* **9**:415.
- 44.- Donnellan, J.E., and R. S. Stafford. 1968. The ultraviolet photochemistry and photobiology of vegetative cells and spores of *Bacillus megaterium*. *Biophys. J.* **8**:17-27.
- 45.- Dow, J. A. 1986. Insect midgut function. *Adv. Insect Physiol.* **19**: 187-328.
- 46.- Dulmage, H.T., J. A. Correa and A. J. Martínez. 1970. Coprecipitation with lactose a means of reversing the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis* J. *Invertebr. Pathol.* **15**:15-20.
- 47.- Dulmage, H.T. and H. De Barjac. 1973. HD-187, a new isolate of *Bacillus thuringiensis* that produce high yields of delta-endotoxin. *J. Invertebr. Pathol.* **22**:273-277.

- 48.- Dulmage, H.T. 1981. Production of bacteria for biological control of insects. En: Biological control of crop production, G.C. Papavizas (ed.), Beltsville Symposia in Agricultural Research. Allanheld, Osmun and Co., Totowa, N.J. 5:129.
- 49.- Dulmage, H.T. and K. Aizawa. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker. New York, N.Y. pp 209-237.
- 50.- Dunkle, R. L. and B. S. Shasha. 1988a. Starch-Encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A Potential New Method for Increasing Environmental Stability of Entomopathogens. Environ. Entomol. 17:1: 120-126.
- 51.- Edlund, T., I. Sidén, and H.G. Boman. 1976. Evidence for two immune inhibitors from *Bacillus thuringiensis* interfering with the humoral defense system of saturniid pupae. Infect. Immun. 14:934-941.
- 52.- Edwards, D.L., J. Payne, and G.G. Soares. 1989. New isolates of *Bacillus thuringiensis* having activity against nematodes. European Patent. Application number: 88307309.0. Publication number: 0 305 426 A3.
- 53.- Ellar, D.J., B.H., Knowles, F.A., Drobniowski, and M. Haider. 1986. The insecticidal specificity and toxicity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin may be determined respectively by an inbinding to membrane-specific receptors followed by a commechanism of cytolysis. In: Fundamental and applied aspect invertebrate pathology, Samson R.A., Vlak J.M. y D. Pet (eds.), Foundation of the 4th International colloquium invertebrate pathology, Wageningen, The Netherlands. pp 7-11.

- 54.- English, L. M. 1992. Organic Gardening - Natural Insecticides. Cooperative Extension Service, Guide H-150. New Mexico State University, Las Cruces, NM.
- 55.- Falcón-Fdz, M. E., O. J. González-Gaona, G. Vejar-Cota y J. Gonzalez-Morales. 1993. Evaluación de infusiones vegetales en el control del "gusano cogollero del maíz" *Spodopetera frugiperda* (Smith) bajo condiciones de campo. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula Pue. Mex. pag 204.
- 56.- Falcon, L.A. 1971. Use of bacteria for microbial control. En: Microbial control of insects and mites, Burges H.D. y N.W. Hussey (eds.), Academic Press, New York, N.Y.
- 57.- Falcon, L.A. 1971. Microbial control as a tool in integrated control programs. En: Biological control, C.B. Huffaker (ed.), Plenum Press, New York, N.Y. pp 346.
- 58.- Farkas, J., K., Sebesta, K., Horská, Z., Samek, and F. Sórm. 1976. Structure of *thuringiensis*, the thermostable exotoxin from *Bacillus thuringiensis*. Collection Czechosloz. Chem. Commun. 42:2843-2845.
- 59.- Faust, R.M. and Bulla. 1982. Bacterial and their toxins as insecticides microbial and viral pesticides. Marcel Dekker, New York, N.Y. 3:75-206.
- 60- Feder, G. And U. Regev, 1975. Biological interactions and environmental effects in the economics of pest control. J. Environ. Econ. Management 2:75-91.
- 61.- Fisher, R. y L. Rosner. 1959. Toxicology of the microbial insecticide thuricide, J. Agric. Food Chem. 7:686.
- 62.- Flinn, J. E. and H. Nack. 1967. What is Happening in Microencapsulation. Chem. Eng. 4:171-178.

- 63.- Fravel, D. R., J.J. Morris, R.D. Lumsden, and W. J. Connick, jr., 1985. Encapsulation of Potential Biocontrol Agents in an Alginate-Clay Matrix. *Phytopathology* 75: 774-77.
- 64.- Frost y Sullivan. 1990. *Biopesticides: A technology impact report*, Frost & Sullivan Inc. New York, N.Y. pp 1-341.
- 65.- Galan-Wong, L. J. et al. 1993. *Biotechnología para la producción de Bioinsecticidas Microbianos centrada en Bacillus thuringiensis*. 1ª Edición. UNAM. Mexico. 101 pags.
- 66.- Galán-Wong, L.J., Rodríguez-Padilla, C., Taméz-Guerra, R.S., Gómez-Treviño, M. y H.T. Dulmage. 1990. GM-2 A new subspecies of *Bacillus thuringiensis* n. subsp. *coahuilensis*. with an unusual form of parasporal inclusion body. *Publicaciones Biológicas. FCB-UANL*. 4:53-58.
67. Gallegos, T. A., 1991. *Utilización de Bagazo de Agave lechuguilla (guishe) como Fuente de nutrientes de Lenta Liberación y como Mejorador de Suelos*. U.A.A.N., Saltillo, Coah.
- 68.- Gelernter, W.D. 1990. *Bacillus thuringiensis*, bioengineering and the future of bioinsecticides. Paper presented at, the Brighton Crop protection conference on pests and diseases, Brighton, U.K.
- 69.- Georghiou, G.P., J., Baker, Z., Al-Khatib, R., Mellon, C., Murray, H., Tran, M., Vasquez, F., Pelsue, and J. Hazelrigg. 1983. *Insecticide resistance mosquito control research*, Annual report 1983, University of California, Los Angeles, E.U.A.

- 70.- Germaine, G. R., and W. G. Murell. 1973. Effect of dipicolinic acid on the ultraviolet radiation resistance of *Bacillus cereus* spore. *Photochem. Photobiol.* **17**:145-154.
- 71.- Giordana, B., F. V. Sacchi, P. Parenti and G. M. Hanozet. 1989. Amino acid transport systems in intestinal brush-border membranes from lepidopteran larvae. *Am. J. Physiol.* **257**:498-500.
- 72.- Goldberg, I. and J. Margalit. 1977. A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against *Anopheles sargentii*, *Uranotaenia unguiculata*, *Culex univittatus*, *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Mosq. News.* **37**:355-358.
- 73.- Goldberg I., B., Sneh, E., Battat and D. Klein. 1980. Optimization of a medium for high yield production of spore-crystal preparation of *B. thuringiensis* effective against the Egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis* Boisdu. *Biotechnol. Lett.* **2**:419-426.
- 74.- Goldberg, M.I. 1988. New *Bacillus thuringiensis* technology. *ASM News.* Washington, D.C. **54**:169-170.
- 75.- Goldberg, M.I. 1989. Protecting corn with natural pesticide proves a challenge. *ASM News.* Washington, D.C. **5**:590-591.
- 76.- Goldman, I.F., J., Arnold, and B.C. Carlton. 1986. Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *J. Invertebr. Pathol.* **47**:317.
- 77.- Gordon, R.E. 1977. Some taxonomic observations on the genus *Bacillus*, in biological regulation of vectors: The saprophytic and aerobic bacteria and fungi, NIH-77-1180, U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington, D.C. pp 67.

- 78.- Gould, F. 1988. Evolutionary biology and genetically engineered crops. *Bio/Science*. **38**:26-33.
- 79.- Grevillius, A. Y., 1905. "Zur Kenntnis der Biologie des Goldafters (*Euproctis chrysorrhoea* L.)," *Botan. Centr. Bieheft.* **18**: 222-322.
- 80.- Griego, V. M., and K. D. Spence. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible light. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**:906-910.
- 81.- Hannay, C.L. 1953. Crystalline inclusions in aerobic spore forming bacteria. *Nature*. **127**:1004.
- 82.- Heimpel, A.M. and T.A. Angus. 1959. The site action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. *J. of Insect Pathol.* **1**:152-170.
- 83.- Hernández, J.L. 1988. Evaluation de la toxicite de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. *Entomophaga*. **33**:163-171.
- 84.- Hofmann, C., P. Lüthy, R. Hutter, and V. Pliska. 1988. Binding of the delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* to brush-border membrane vesicles of the cabbage butterfly (*Pieris brassicae*). *FEBS Lett.* **85**:91.
- 85.- Hofmann, C., H. Vanderbruggen, H. Hofte, J. VanRie, S. Jansens, and H. Van Mellaert. 1988. Specificity of *Bacillus thuringiensis* deltadelta-endotoxin is correlated with the presence of high affinity binding sites in the brush border membrane of target insect midguts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**:7844-48.

- 86.- Höfte, H., H. Greve., J. Seurinck, S. Jansen and J. Mahillon. 1986. Structural and functional analysis of a cloned delta endotoxin of *Bacillus thuringiensis* Berliner 1715. Eur. J. Biochem. **161**:273-80.
- 87.- Höfte, H. and H.R. Witeley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Reviews. **53**:242-55.
- 88.- Huber-Lukac, M., H. Herbst, P. Lüthy, and D.G. Braun. 1982. Monoclonal antibodies against functionally distinct sites on the deltadelta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. Experienta. **38**:1103-105.
- 89.- Ignoffo, C.M. 1973. Effects of entomopathogens on vertebrates, Ann. N.Y. Acad. Sci. **217**:141.
- 90.- Illescas, R. 1943. La teoría Química de la Formación de Nixtamal. Revista de la Soc. Mex. de Historia Natural (México). Tomo 4 (3-4):129-134.
- 91.- Ishiwata, S. 1901. On a kind of severe flasherie (sotto disease). Dainhan Sanbshi Kaiho **9**:1-5.
- 92.- Jamieson, K.B. 1990. Thirty years of *Bacillus thuringiensis*. Research pay off bulletin. De L'Institut pour la repression des ravageurs. Forestiers, Canada. **9**:2-7.
- 93.- Johnson, D.E., G.L. Brookhart, K.J. Kramer, B.D. Barnett, and W.H. McGaughey. 1990. Resistance to *Bacillus thuringiensis* by the Indian meal moth *Plodia interpunctella*: Comparison of midgut proteinases from susceptible and resistant larvae. J. of Invertebr. Pathol. **55**:235-44.

- 94.- Jutsum, A.R. 1988. Commercial application of biological control: Status and prospects. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **318**: 357-73.
- 95.- Knowles, B.H. and D.J. Ellar. 1987. Colloid-osmotic lysis a general feature of the mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* -endotoxins with different insect specificity, *Biochem. Biophys. Acta.* **924**:509-18.
- 96.- Krieg, A. and G.A. Langenbruch. 1981. Susceptibility of arthropod species to *Bacillus thuringiensis*. En: *Microbial control of pests and plant diseases*, H.D. Burges (ed.), Academic Press, London. pp 837.
- 97.- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch, and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*: A new pathology effective against larvae of coleoptera. *J. Appl. Entomol.* **96**:500-08.
- 98.- Krieg, W., A. Schnetter, M. Huger and G.A. Langenbruch. 1987. *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*, strain. BI 256-82 a third pathotype within the H serotype 8a 8b. *System. Appl. Microbiol.* **9**:138-141.
- 99.- Kume, T., R. Taguchi and H. Ikezawa. 1991. Action of phosphatidylinositol-specific phospholipase C from *Bacillus thuringiensis* is significantly influenced by coexisting lipids in substrate-detergent micelles. *Chem. Pharm. Bull.* **39**:2063-67.
- 100.- Kume, T., R. Taguchi and H. Ikezawa. 1991. The effects of coexisting lipids on the action of *Bacillus thuringiensis* phosphatidylinositol-specific phospholipase C toward liposomal substrate. *Chem. Pharm. Bull.* **39**:2980-83.



- 101.- Kurstak, E., P. Tijssen, and K. Maramorosch. 1978. Safety considerations and development problems make an ecological approach of biocontrol by viral insecticides imperative. En: *Viruses and Environment*, Kurstak E. y K. Maramorosch, (eds.), Academic Press, New York, N.Y. pp 571.
- 102.- Lane, N.J., J.B. Harrison, and W.M. Lee. 1989. Changes in microvilli and Golgi-associated membranes of lepidopteran cells induced by and insecticidally active bacterial delta-delta-endotoxin. *J. Cell Sci.* **93**:337-47.
- 103.- Lambert, B. and M. Peferoen. 1992. Insecticidal Promise of *Bacillus thuringiensis*: Facts and mysteries about a successful biopesticide. *BioScience* **42**:112-122.
- 104.- Leach, W. H. 1965. Gelatinization of Starch, In: *Starch: Chemistry and Tecnology*, Vol I. Ed. By R. L. Whistler, and E. P. Paschall, Academic Press, New York.
- 105.- Leyva V. J., 1991. *Biología , Ecología y Comportamiento de Insectos Entomofagos*. Memorias del II Curso de Control Biológico. Buenavista, Saltillo, Coah. México. Pag 20-34.
- 106.- López, A. B. 1993. Evaluación de insecticidas de diferente grupo toxicológico para el control de "gusano cogollero" *Spodoptera frugiperda* (Lepidopera: Noctuidae) en maíz en el Valle del Fuerte Sinaloa. Memorias del XXVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula, Pue. Mex. pag 157.
- 107.- Luck, R. F., R. Van der Bosch, and R. Garcia. 1977. Chemical insect control: A troubled pest management strategy. *Bioscience* **27**:606-11.

- 108.- Lüthy, P., J.L. Cordier, and H.M. Fischer. 1982. *Bacillus thuringiensis* a bacterial insecticide: Basic considerations and application. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 35.
- 109.- Lüthy, P., C. Hofmann, and F. Jaquet. 1985. Inactivation of the delatadelta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* by tannin. FEMS Microbiol. Lett. **28**:31-33.
- 110.- Martin, P.A.W., E.B. Haransky, R.S. Travers, and C.F. Reichelderfer. 1985. Rapid biochemical testing of large numbers of *Bacillus thuringiensis* isolates using agar dots. Bio/Tech. **3**:386-92.
- 111.- Martin, P. A. W., and R. S. Travers. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ, Microbiol. **55**: 2437-2442.
- 112.- Martinez, D. M., 1972. Quimica y fisica de los altos polimeros y materias plásticas. Ed. Alhambra. México. 296 pag.
- 113.- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. **229**:193-195.
- 114.- McGaughey, W.H and M.E. Whalon. 1992. Managing insects resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. Science. **258**:1451-55.
- 115.- McGuire, M. R. 1993. Apuntes del Curso de Biotecnología Agrícola, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. San Nicolás de los Garza N. L. México.
- 116.- McGuire, M.R., B.S. Shasa, L.C. Lewis, R.J. Bartelt, and K. Kinney. 1990. Evaluation of granular starch formulation of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **83**:2207-10.

- 117.- McGuire M. R., B. S. Shasha, L. C. Lewis, R. J. Bartelt and K. Kinney. 1990. Field Evaluation of Granular Starch Formulations of *Bacillus thuringiensis* Against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econo. Entomol. **83**:6: 2207-10.
- 118.- Meadows, J., S.S. Gill, and L.W. Bone. 1990. *Bacillus thuringiensis* strains affect population growth of the free-living nematode *Turbatrix aceti*. Invertebr. Reprod. Dev. **17**:73-76.
- 119.- Meadows, M.P., D.J. Ellis, J. Butt, P. Jarrett, and D. Burges. 1992. Distribution, frequency, and diversity of *Bacillus thuringiensis* in an animal feed mill. Appl. Environ. Microbiol. **58**: 1344-50.
- 120.- Medcalf, D. F. 1973. Structure and Composition of Cereal Components as Related to their Potential Industrial Uses of Cereal. Ed by Pomerans Y. AACC. st. Paul Minn.
- 121.- Morales-Ramos, L. H. 1993. Formulación de Biopesticidas, en: Biotecnología para la Producción de Bioinsecticidas Microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Ed. por: Galán-Wong et al. UNAM. Mex. 101 pags.
- 122.- Morris, O.H. 1982. Bacteria as pesticides: Forest applications. En: Microbial and viral pesticides, E. Kurstak (ed.), Marcel Dekker, New York, N.Y. pp 239.
- 123.- Muthukumar, G., and K. W. Nickerson. 1987. The glycoprotein toxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* indicates a lectinlike receptor in the larval mosquito gut. Appl. Environ. Microbiol. **53**:2650-55.
- 124.- Norris, O.N. 1988. Current use of and research on *Bacillus thuringiensis* in Canada. International Symposium on Insecticide of *Bacillus thuringiensis*, Hubei Academy of Agricultural Science, Wuhan, People's Republic of China, Oct. 14-18.

- 125.-Ohba, M. and K. Aizawa. 1986. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in soils of Japan. *J. Invertebr. Pathol.* **47**:277-88.
- 126.- Payne, C.C. 1988. Insect pest management concepts: The role of biological control. En: *Biotechnology biological pesticides and novel plant. Pest resistance for insect pest management*, Roberts D.W. y R.R. Granados (eds.), *Proceedings of the Center Boyce Thompson Institute for Plant Research. Cornell University, U.S.A. July.* pp 1-7.
- 127.- Pendleton, I.R. 1969. Insecticides of crystal forming bacteria. *Process Biochem.* pp 29-32.
- 128.- Percy, J. and P.G. Fast. 1983. *Bacillus thuringiensis* crystal toxin: Ultrastructural studies of its effect on silkworm midgut cells. *J. Invertebr. Pathol.* **41**:86-98.
- 129.- Perlark, F.J., R.W. Deaton, T.A. Armstrong, R.L. Fuchs, S.R. Sims, J.T. Greenplate, and D.A. Fischhoff. 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology.* **8**:939-42.
- 130.- Petras, S.F. and L.E. Casida. 1985. Survival of *Bacillus thuringiensis* spores in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**:1496-501.
- 131.- Philbrick, J. and H. Philbrick. 1984. *The Bug Book- harmless insect controls.* Writers House inc. Library of congress. USA. 119 pag.
- 132.- Pimentel, D., J. Krummel, D. Gallahan, J. Hough, A. Merrill, I. Schreiner, P. Vittum, F. Koziol, E. Back, D. Yen, and S. Fiance. 1981. A cost-benefit analysis of pesticide use in U.S. food production. En: *CRC Handbook of Pest Management in Agriculture*, D. Pimentel (ed.), CRC Press, Boca Raton, Florida. vol. **II**. pp 27.

- 133.- Pimentel, D., H. Acquay, M. Biltonen, P. Rice, M. Silva, J. Nelson, V. Lipner, S. Giordano, A. Horowitz, and M. D'Amore. 1992. An assessment based on currently available US data, although incomplete, tallies \$ 8 billion in annual costs. *Bio/Science*. 42:750-760.
- 134.- Pozsgay, M., P. Fast, H. Kaplan and P.R. Carey. 1987. The effect of sunlight on the protein crystals from *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* HD-1 and NRD12; a raman spectroscopic study. *J. Invertebr. Pathol.* 50: 246-53.
- 135.- Prasad, S. and Y.I. Shetna. 1975. Enhancement of immune response by the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 62:517-23.
- 136.- Prasad, S. and Y.I. Shetna. 1976. Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Biochem. Rev.* 47:70-77.
- 137.- Prasad, S. and Y.I. Shetna. 1976. Mode of action of a purified protein from the proteinaceous crystal of *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* on Yoshida ascites sarcoma. *Cells. Antimicrob. Agents and Chemother.* 10:293-96.
- 138.- Prasertphon, S., P. Areekul, and Y. Tanada. 1973. Sporulation of *Bacillus thuringiensis* in host cadavers. *J. Invertebr. Pathol.* 21: 205-207.
- 139.- Pusztai, M., Fast, P., Gringorten L., Kaplan, H., Lessard, T. y P.R. Carey. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. *Biochem. J.* 273:43-47.
- 140.- Rajnchapel-Messai, J. 1990. Les biopesticides. *Biofutur*. Juillet/Aout. pp 23-34.

- 141.- Regev, U., H. Shalit, and A. P. Gutierrez. 1983. On optimal allocation of pesticides: The case of pesticide resistance. *J. Environ. Econ. Management* **10**:86-100.
- 142.- Rice, E. L. 1983. Plant-Insect and Insect-Insect Chemical Interactions in Agriculture, in: *Pest Control with nature's chemicals: Allelochemicals and Pheromones in Gardening and Agriculture*. University of Oklahoma Press: Norman.
- 143.- Rigby, S. 1991. *Bt in Crop Protection*, PJB Publ., Richmond, Surrey, UK.
- 144.- Robles, L. R., R. Robles, L. Aldana, A. Luevano y T. Rodriguez. 1993. "Bioensayos con larvas de *Spodoptera frugiperda*, usando extractos de plantas". *Memorias del XVIII Congreso Nacional de Entomología, Cholula Pue. Mex.* pag 202.
- 145.- Rowe, G. E. and A. Margaritis. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. En: *The Critical Reviews in Biotechnology*, G.G. Stewart y Inge Rusell (eds.), CRC Press. Boca Ratón, Florida. **6**:87-123.
- 146.- Samples, J.R. and H. Buettner. 1983. Corneal ulcer caused by a biologic insecticide (*Bacillus thuringiensis*). *Am. J. Ophthalmol.* **95**:258.
- 147.- Samples, J.R. and H. Buettner. 1983. Ocular infection caused by a biological insecticide. *J. Infect. Dis.* **148**:614.
- 148.- SARH. 1986. Avances de propuestas de investigación. 1985-1986 en cultivos básicos, CIAPAC-CAETECO. Tecmán, Col., México.
- 149.- SAS Institute. 1989. *SAS user's guide: statistics* SAS institute. Cary N.C.

- 150.- Sebesta, K. and K. Horská. 1968. Inhibition of DNA-dependent RNA polymerase by the exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *galleriae*. *Biochem. Biophys.* **164**:281-282.
- 151.- Sebesta, K., K. Horská, and J. Ankova. 1969. Inhibition of the novo RNA synthesis by the insecticidal exotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *gelechiae*. *Collect. Czach. Chem. Commun.* **34**: 891.
- 152.- Shieh, T.R. Bannockborn and M.H. Rogoff. 1973. Production of exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. United States Patent Office.
- 153.- Sifuentes, J.A. 1978. Plagas del Maíz de México, algunas consideraciones sobre su control. Folleto de divulgación No. 58. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, México.
- 154.- Skot, L., P. Stephen, A.N. Harrison, M.R. Lancer, and B. C. Clifford. 1990. Expression of insecticidal activity in *Rhizobium* containing the delta-endotoxin gene cloned from *Bacillus thuringiensis* subsp. *tenebrionis*. *Plant and Soil.* **127**:285-95.
- 155.- Stevens, C. F. 1991. Making a submicroscopic hole in one. *Nature* **349**:657-58.
- 156.- Thomas, W.E. and D.J. Ellar. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* crystal delta-endotoxin: effects on insect and mammalian cells in vitro and in vivo. *J. Cell Sci.* **60**:181.
- 157.- Thompson, M. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* isolate having anti-protozoan activity. European Patent. Application number: 91305048.0. Publication number: 0 461 799 A3.

- 158.- Travers, R.S., P.A. Martin, and C.F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus spp.* Appl. Environ. Microbiol. **53**:1263-66.
- 159.- Trujillo A. J., 1991., Metodología del Control Biológico. Memorias del II Curso de Control Biológico. Buenavista Saltillo, Coah. México. Pag 43-46.
- 160.- Van Rie, J., W.H. McGaughey, D.E. Johnson, B.D. Barnett, and H. Van Mellaert. 1989. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science. **247**:72-74.
- 161.- Walker, H. L. and W. J. Cornnick Jr. 1983. Sodium alginate for production and formulation of mycoherbicides. Weed Sci. **31**:333-36
- 162.- Waalwijk, C., A. Dullemans, and C. Maat. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiol. Lett. **77**:257-264.
- 163.- Winder, W. R. and H. R. Whiteley. 1989. Two highly related insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis* subesp. *kurstaki* possess different host range specificities. J. Bacteriol. **171**:965-74.
- 164.- Young, T.K. and H.T. Huang. 1970. The  $\beta$ -exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. **15**:100-108.



