INTRODUCCION.

Actualmente las plagas de insectos de cultivos agrícolas y árboles forestales, representan un gran problema para todos los países, por tal motivo para llevar a cabo un control de estas, se aplican anualmente 2.5 millones de tóneladas de productos químicos.[43]

Recientemente la humanidad preocupada por solucionar los problemas de contaminación ambiental ocasionados por el uso indiscriminado de insecticidas químicos para el combate de plagas, ha implementado un programa de manejo integral de plagas, del cual forma parte importante del control biológico, definido como " el manejo de enemigos naturales (depredadores, parásitos, y patógenos de plagas) y enemigos benéficos selectos (ciertos antagonistas y alelópatas) y sus productos, para reducir poblaciones de plagas y sus efectos.[15,43]

Las perspectivas de éxito del control biológico son alentadoras, de manera que gran cantidad de investigaciones se están realizando, enfocadas en llevar a cabo la producción comercial a gran escala de bioinsecticidas para la protección de los cultivos agrícolas. De hecho el mercado de los agentes de control biológico alcanzó en el año de 1992 un 1.6 % del mercado mundial de insecticidas, lo cual se calcula en 6,000 millones de dólares.[44]

Dentro del control biológico microbiano se conocen alrededor de 10,000 especies de microorganismos, dentro de los cuales están 2,000 microorganismos patógenos de insectos, destacándose como entomopatógenos 750 especies de hongos, 700 virus, 300 protozoarios y cerca de 100 especies de bacterias; de este último grupo de microorganismos, *Bacillus thuringiensis* sobresale entre los bioinsecticidas de más éxito comercial, ya que actualmente representa el 90 % de los bioinsecticidas usados.[14,28] Lo que lo hace como el agente de control biológico más popular, con ventas en 1995 de 90 millones de dólares, con 67 productos registrados y más de 450 usos y formulaciones, esperandose un incremento para el 2000 de cerca de 150 millones de dólares.[51] En el secor agrícola han sido utilizados productos a base de *B. thuringiensis* en cultivos de trigo, maíz, algodón, frutales, sorgo y soya, entre otros, casi exclusivamente para el control de lepidópteros filófagos. Aunque su uso es limitado comparado con los insecticidas convencionales, existe un creciente interés en el manejo integral de plagas (MIP) debido a un menor riesgo de desarrollo de resistencia, a políticas nacionales sobre el uso de los pesticidas convencionales y a los altos costos de desarrollo de nuevos insecticidas químicos.[15]

Desde su hallazgo como un agente de control biológico se han realizado diversas investigaciones, entre ellas, el desarrollar nuevas tecnologías de formulación usando como agente activo a *Bacillus*

thuringiensis e incrementar la eficiencia de este en el campo. Entre las ventajas comerciales que presentan las tecnologías de formulación a base de *Bacillus thuringiensis* tenemos: el bajo costo de producción, la toxicidad especifica contra insectos, la fácil formulación, la ejecución de un control rápido, la baja residualidad y la larga vida de anaquel de los productos. Otras de las ventajas de esta tecnología, es que permite la incorporación de varios aditivos como los protectores solares, los cuales extienden la actividad residual, y los atrayentes alimenticios, los cuales reducen la cantidad de ingrediente activo necesario para el control de insectos plaga blanco.[85]

Cabe destacar que en la actualidad no se existen formulaciones de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica contra *Diatraea saccharalis*, sin embargo hay reportes exitosos acerca de la existencia de productos con actividad tóxica contra otras plagas, como en el caso de *Ostrinia nubilalis*, *Galleria mellonella*, *Plodia interpunctella y Anagasta kuehniella*, los cuales pertenecen a la Familia Pyralidae, al igual que *D. saccharalis*. Esto nos hizo suponer la hipótesis de que *Diatraea saccharalis* podría ser susceptible a ser controlada por *Bacillus thuringiensis*.

Bacillus thuringiensis ha resultado ser efectivo para controlar plagas que atacan plantas y defoliadores de bosques, aunque para manejar plagas que atacan los tejidos internos de las plantas como los insectos barrenadores, su efectividad se ve limitada. Sin embargo, el control es efectivo cuando los barrenadores se alimentan por algún tiempo sobre las hojas antes de invadir los tejidos internos de la planta, por lo que la mortalidad del insecto puede incrementarse utilizando agentes fagoestimulantes específicos en la formulaciones, los cuales aseguran la ingestión de dosis letales del agente de biocontrol, antes de que el insecto penetre en la planta.

El insecto barrenador del tallo de la caña de azúcar *D. saccharalis* es la plaga más importante que ataca a los cultivos como la caña de azúcar, maíz, sorgo, arroz y zacates forrajeros. El impacto que presenta este insecto radica en su amplia distribución a lo largo del continente americano, llegando a causar índices de infestación de entre el 30- 35% de los cultivos de caña de azúcar y maíz a nivel nacional.[22]

Hoy en día, en México el combate de *Diatraea saccharalis* consiste exclusivamente en el uso de insecticidas químicos, así que puede ser interesante evaluar la efectividad de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis* en comparación con los pesticidas químicos comúnmente en uso, como un medio alternativo de manejo para controlar esta plaga. La agroindustria de la caña de azúcar en la actualidad presenta grandes problemas a nivel nacional debido a la falta de capital para inversión y a causa de las pérdidas en el cultivo ocasionadas por insectos plaga. Estos inconvenientes deben buscárseles solución, debido a que es uno de los cultivos más importantes a nivel nacional, ya que genera una participación del 1% del P.I.B., y esta relacionado con el 2.4% en el sector manufacturero y el 12.5% en la industria de los alimentos y bebidas.[22]

RESUMEN.

Para desarrollar una formulación de *Bacillus thuringiensis* adecuada para el control del insecto barrenador del tallo de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*, iniciamos con el establecimiento de la cría masiva de *D. saccharalis* a nivel de laboratorio, mediante la utilización de la dieta artificial de Shorey, la cual fue modificada para adaptarla a *D. saccharalis*, para esto se incrementó la concentración de agar de 14g a 20g y la concentración de azúcar de 13g a 25g, al realizar una comparación de la composición de esta con los componentes de dietas reportadas para la cría específica de este lepidóptero. El ciclo de desarrollo del insecto consta de 36- 40 días bajo las condiciones operacionales de 26-27°C, una humedad relativa del 80% y un fotoperíodo de 12/12 horas. Los pesos promedios de las pupas se incrementaron en un 5% tanto en los machos como en las hembras, comparando los registros de los mismos en la primera generación con los obtenidos en la quinta generación; así también son superiores a los publicados, en donde los pesos de referencia son de 0.0403 g y 0.0756 g para los machos y hembras respectivamente, y los obtenidos en el laboratorio fueron de 0.0719 g y 0.1182 g para machos y hembras.

Se probó el efecto tóxico de las cepas GM7, GM10, GM34, HD2, HD9, HD29, HD37, HD59, HD73, HD133, HD137 y HD551, de las cuales 3 cepas son nativas y 9 de la colección H.D. La mortalidad generada por las cepas probadas bajo la dosis de 50 μg/ ml fueron de 62% para la cepa **GM7**, 69% para la **GM10**, 77% para la **GM34**, 37% para la **HD2**, 11% para la **HD9**, 57% para la **HD29**, 43%% para la **HD37**, 41% para la **HD59**, 51% para la **HD73**, 71% para la **HD133**, 59% para la **HD137** y 67% para la cepa **HD551**. Las cepas más tóxicas por orden de intensidad fueron la GM34, HD133, GM10, HD551 y GM7. A las cepas seleccionadas se les determinaron algunos parámetros toxicológicos como su LD_{50} y TL_{50}. Las LD_{50} obtenidas fueron: **33.21 μg/ ml** para la cepa GM34, **67.22 μg/ ml** para la cepa HD551, **85.63 μg/ ml** para la cepa HD133, **95.99 μg/ ml** para la cepa GM7, **104.99 μg/ ml** para la cepa GM10, **65.91 μg/ ml** para la combianción de cepas GM10/ GM34 y **67.68 μg/ ml** para la combinación de cepas HD133/ HD551. Con esto la cepa más tóxica de *Bacillus thuringiensis* resulta ser la GM34. El TL_{50} para esta cepa fue de 4.55 ± 0.67 días. Se elaboraron 20 soportes de formulación a partir de gelatina, pectina, gelatina: pectina 1:2 y 1:1 como matrices encapsulantes, solos o en combinación con un aditivo

fagoestimulante como la panoja de maíz, melaza, polvo de zanahoria y coax. Los soportes con la mayor acción fagoestimulante resultaron ser la gelatina- panoja y gelatina- melaza con 4.59 ± 1.99 y 3.14 ± 1.85 larvas atraídas respectivamente de un total de 10 larvas, donde se utilizó caña de azúcar como un control positivo que presentó 3.85 ± 190 larvas atraídas. Los soportes que presentan fagoestimulantes y los trozos de caña de azúcar no presentan diferencia significativa en el grado de preferencia, atrayendo 2.23 ± 1.76 y 3.85 ± 190 larvas respectivamente. La matriz encapsulante sin aditivos que provocó el mayor efecto fagoestimulante, lo presentó la gelatina atrayendo 2.73 ± 2.07 larvas, mientras que el fagoestimulante que presentó la mayor aceptación fue la panoja atrayendo 3.15 ± 1.93 larvas.

Las formulaciones granulares más toxicas contra *Diatraea saccharalis* a nivel laboratorio son las constituidas de gelatina- panoja- B.t., gelatina- melaza- B.t. y leptinox ®, causando un 40, 32, y 26% de mortalidad a las 24 horas, incrementándose a 100, 92 y 88% de mortalidad a los 7 días, mientras que las formulaciones asperjables más tóxicas resultaron ser todos los tratamientos donde el ingrediente activo era *Bacillus thuringiensis* indistintamente de la dosis, como los tratamientos gelatina-panoja- B.t., gelatina- melaza- B.t. y leptinox ®, generando una mortalidad que oscila de 24.22 ± 0.58 a 25.00 ± 0.00 equivalentes al 97 a 100% de larvas muertas.

A nivel invernadero, los formulados más efectivos fueron los conformados por gelatina-melaza- B.t.- asperjable, gelatina- panoja- B.t.- asperjable y leptinox ® asperjable, produciendo el menor número de tallos afectados y de entrenudos afectados, reflejándose en un mayor desarrollo de las plantas.

Los formulados a partir de gelatina- melaza- B.t.- asperjable y gelatina- panoja- B.t.- asperjable generaron los mas bajos porcentajes de infestación y de intensidad, así como los menores grados de intensidad, siendo los que mayor protección generaron a nivel de invernadero, encontrándose solo un 0 y 1% de entrenudos afectados respectivamente.

Los mejores tratamientos para llevar a cabo un control efectivo lo conforman los formulados asperjables a base de Gelatina- B.t., en donde *D. saccharalis* solo logró producir un 1% de daño a nivel invernadero.

ANTECEDENTES.

HISTORIA.-

El conocimiento de organismos capaces de generar enfermedades en los insectos se remonta a la antigüedad cuando fueron descritos por vez primera en China los efectos del hongo *Cordyceps* sobre el gusano de seda *Bómbix mori*. Desde entonces, el número de enfermedades citadas ha ido en aumento, viéndose incrementado especialmente a partir del siglo XIX, coincidiendo con el desarrollo de la microbiología. Muchos de los organismos entomopatógenos que las causan son susceptibles de ser utilizados por el hombre en el control de densidades de poblaciones de insectos, y pertenecen e diferentes grupos taxonómicos, principalmente hongos, bacterias, nematodos y virus. Sin embargo, hasta el momento, solo unos pocos han sido desarrollados como materias activas de productos insecticidas. De todos ellos, los más utilizados y extendidos comercialmente en todo el mundo son, sin duda, los basados en la bacteria *Bacillus thuringiensis.* [14]

La historia acerca de *Bacillus thuringiensis* da comienzo a inicios del siglo pasado, cuando un Bacteriólogo Japonés Ishawata en 1901, aisló una bacteria esporígena de forma bacilar a partir de la hemolinfa del gusano de seda *Bombyx mori*, a la cual llamó *Bacillus sotto*. Diez años más tarde, fue redescubierto un organismo similar por Berliner de la linfa de larvas de *Anagasta kuehniella*, en Alemania. El investigador Alemán lo llamo *Bacillus thuringiensis*, debido a que tal microorganismo fue aislado en Turingia, Alemania, y con el cual en la actualidad se le reconoce. Berliner reportó la presencia de un cuerpo paraesporal, sin embargo, no lo relacionó con la actividad tóxica del microorganismo.[44, 83]

No fue sino hasta 1915 en que un grupo de investigadores japoneses encontró que solo los cultivos esporulados eran tóxicos para larvas del gusano de seda. Ellos sugerían que la toxicidad observada se debía a la acción de toxinas.[44]

Los primeros ensayos en los que se usó a *Bacillus thuringiensis* para el control de insectos, tomó lugar a finales de 1920 y principios de 1930, contra el gusano europeo del maíz *Ostrinia nubilalis*, en el sureste de Europa como parte de un proyecto internacional de los Estados Unidos. Durante las siguientes dos décadas, pruebas de campo se realizaron contra plagas de lepidópteros en Europa y Estados Unidos. El primer producto comercial llamado Sporeine estuvo disponible en el año de 1938 en Francia, sin embargo, su desarrollo como bioinsecticida no alcanzo los niveles deseables de comercialización por dos razones principalmente. La primera de ellas porque tres años más tarde se descubrirían las propiedades insecticidas de las moléculas químicas orgánicas de síntesis, lo cual marco el inicio de la era del control químico que rápidamente acaparo todo el interés del mercado de los plaguicidas. La segunda, porque el espectro de huéspedes de *B. thuringiensis* se restringía al orden lepidóptera en ese momento, en contraposición con el amplio espectro de huéspedes que caracterizaba a los insecticidas químicos que acababan de aparecer en el mercado.[13] No fue sino hasta la década de los 50´s en que varios países iniciaron la producción comercial extensiva de otros productos como Bakthane L-69, Biotrol BTB, Parasporin y Thuricide, los cuales utilizaron como ingrediente activo a *B. thuringiensis* variedad *thuringiensis*.[25]

Hannay sugirió en 1953, que el cristal paraesporal era el agente tóxico. Esto queda comprobado por Angus en 1954. Mas tarde, Hannay y Fitz- James demuestran la naturaleza proteica del cristal.

Un avance mayor ocurre cuando el Dr. Howard T. Dulmage y Clayton Beegle del U.S.D.A. Agricultural Research Service, forman la primera colección de *Bacillus thuringiensis.*

Así mismo cuando la Dra. H. de Barjac y A. Bonnefoni, en Francia en el año de 1962 proponen por primera vez una clasificación serológica, en base a los antígenos flagelares que presenta este bacilo.

Tiempo después en el año de 1969, ocurrió un evento mayor el cual provió de ímpetu en las investigaciones sobre *B. thuringiensis*, cuando el Dr. H.T. Dulmage logró aislar en los Estados Unidos, una cepa de *B. thuringiensis*, resultando 20 a 200 veces más potente que todas las especies ya conocidas, a la cual denomino *B. thuringiensis* variedad kurstaki (HD- 1), siendo eventualmente adoptado por todas las compañías, como ingrediente activo para sus respectivos productos comerciales.[17, 25]

Además, es importante mencionar el descubrimiento hecho en 1977 por Goldenberg y Margalit, los cuales aíslan la primera cepa de *Bacillus thuringiensis* patógena para dípteros, hoy conocida como *B. thuringiensis* variedad israelensis, y lo cual abrió nuevos mercados, siendo el primer producto comercial de *B. thuringiensis* para el control de larvas de mosquitos y la mosca negra, incrementándose así las ventas globales en un 0.5% del mercado de los bioinsecticidas.[15, 25] En 1981, Krieg aisló otra especie de *Bacillus thuringiensis* a partir de pupas muertas del gusano de la harina, la cual denominó variedad tenebrionis. Esta subespecie es altamente tóxica contra larvas de *Agelastica alni* y *Leptinotarsa decemlineata*. La concientización social de los problemas derivados del control químico, por un lado, y, por otro, la ampliación del espectro de huéspedes de *B.* thuringiensis mediante el redescubrimiento de nuevas cepas con actividad insecticida mas diversificada, renovó el interés por desarrollar comercialmente bioinsecticidas basados en esta bacteria. A partir de entonces, aumento de modo

significativo el esfuerzo realizado por los gobiernos, universidades y el sector industrial, poniendo en marcha programas de investigación que han dado como resultado el descubrimiento de muchas cepas de *B. thuringiensis*.[13] Actualmente se estima en 40,000 especies de *B. thuringiensis* las cuales están registradas dentro de la colección mundial.[44]

MORFOLOGÍA.-

Bacillus thuringiensis es un bacilo Gram positivo, esporulado, entomopátogeno facultativo, con un tamaño promedio de 2 a 5 µm por 1 a 1.2 µm, perteneciente a la familia *Bacillacea*, presenta flagelos perítricos, a excepción de una cepa y se reproducen por fisión binaria durante su ciclo celular vegetativo, además es capaz de formar endosporas dentro de un esporangio cuando los nutrientes se agotan o cuando el medio ambiente llega a ser adverso, en donde según el arreglo de la morfología y ubicación de la espora, *Bacillus thuringiensis* esta situado en el grupo 1 del género, en donde están aquellas especies con espora elipsoidal que no provocan hinchamiento del perfil bacilar[36]; es comúnmente encontrado en el medio ambiente como flora del suelo.[44] La principal diferencia entre *Bacillus thuringiensis* y otros bacillos estrechamente relacionados es la formación, durante el proceso de esporulación, de uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica adyacentes a la espora. Algunos de estos cristales paraesporales son tóxicos para ciertas especies de insectos, propiedad que ha conferido a este organismo un enorme interés por su inclusión en formulados fitosanitarios de alta eficiencia y especificidad y bajo impacto sobre el medio ambiente.[12]

Durante la esporulación sobreproducen un número limitado de proteínas, dentro de las cuales está un cristal proteico, de un peso molecular cercano a los 130 kD el cual

es liberado al medio cuando las paredes celulares son degradadas al término de la esporulación. Este cristal puede representar mas del 30 % del peso seco del esporangio maduro, el cual suele ser tóxico a insectos y efectivo contra lepidópteros, dípteros, coleópteros, afidos, nemátodos y ácaros. *B. thuringiensis* produce cerca de 25 cristales insecticidas de morfología variable según la variedad de la que se trate, la diversidad de las formas es dependiendo de las proteínas que lo integran, encontrándose cristales bipiramidales, cúbicos, romboidales, esféricos, rectangulares, triangulares e irregulares, con tamaños desde los 350 nm de diámetro en algunos cristales irregulares, a los 2μm de longitud en muchos cristales bipiramidales [36, 62] Los genes que codifican para este cristal generalmente se encuentran dentro de plásmidos, aunque se han encontrado algunos en localización cromosomal. [4, 44] El cristal de la mayoría de las cepas de *Bacillus thuringiensis* contiene entre tres y cinco δ- endotoxinas, cada una de las cuales tiene su propia especificidad insecticida. La toxicidad y efectividad insecticida de una cepa bacteriana viene determinada por la combinación de δ- endotoxinas y la proporción relativa de las mismas. En *B. thuringiensis*, hasta la fecha, se han identificado mas de 200 proteínas tóxicas diferentes que ofrecen un recurso natural para su utilización en el control de plagas.

Las cepa que han alcanzado un mayor desarrollo comercial pertenecen principalmente a cuatro serovariedades. Las de *B. thuringiensis* serovar. *kurstaki* y *B. thuringiensis* serovar. *aizawai* tienen actividad insecticida para larvas de lepidópteros, las de *B. thuringiensis* serovar. *israelensis*, son tóxicas para larvas de dípteros y las de *B. thuringiensis* serovar. *morrisoni* (variedad *tenebrionis)* tienen efecto insecticida contra algunas especies de coleópteros. Estas cepas constituyen la materia activa de distintos formulados comerciales que en su conjunto, representan más del 90% de los bioinsecticidas actualmente comercializados.[14]

EVOLUCIÓN DE *Bacillus thuringiensis* COMO AGENTE DE CONTROL BIOLÓGICO.

Aunque *Bacillus thuringiensis* fue comercializado hace mas de 40 años, su uso se ha incrementado significativamente en los últimos 10 años. Esto se debe, principalmente, a la demanda pública del uso de plaguicidas menos tóxicos para los consumidores, trabajadores, el medio ambiente y la creciente demanda de productos que sean efectivos en el control de insectos resistentes a insecticidas químicos. Simultáneamente con el aumento de la aceptación de los insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, se han hecho esfuerzos para el mejoramiento de los rendimientos en los métodos de producción, las técnicas de formulaciones y la obtención de nuevas cepas capaces de atacar diversas plagas. [32]

Han pasado más de tres décadas desde que se empezaron a utilizar las primeras preparaciones comerciales de *B. thuringiensis* y a la fecha la bioseguridad es una de las ventajas principales que ofrece este insecticida microbiano. Diversas razones entre las que destacan especificidad, virulencia y potencia contra los insectos blanco, han convertido a esta bacteria en uno de los candidatos más atractivos para el desarrollo comercial.

Setenta años después de su descubrimiento a principio de este siglo, *Bacillus thuringiensis* capturó la atención de pocos microbiólogos y entomólogos. Ahora, cien años después, los científicos estudian una amplia variedad de disciplinas, para probar sus secretos en el ámbito molecular, fisiológico y ecológico. Hoy *Bacillus thuringiensis* no es solamente el más exitoso insecticida microbiano comercial con aplicación mundial para la protección de cultivos, bosques y la salud humana, sino está también comenzando a reemplazar a los insecticidas químicos convencionales en varias áreas de aplicación.

Durante los 80´s, la convergencia de nuevas técnicas, especialmente aquellas proporcionadas por la tecnología del DNA recombinante, y el cambio de actitudes públicas y políticas hacia el uso de estos plaguicidas, precipitó un incremento drástico en la investigación de *Bacillus thuringiensis* por la industria, gobierno e instituciones académicas de investigación. El bajo costo de desarrollo, con la alta diversidad de cepas y toxinas, así como también el buen prospecto para llevar a cabo la manipulación genética, ha provisto las bases para el desarrollo de nuevas generaciones de productos más efectivos y experimentalmente aceptables para el control de insectos.[25]

MODO DE ACCIÓN DE LA TOXINA.-

El insecto blanco ingiere la formulación la cual contiene como ingredientes activos, esporas viables de *Bacillus thuringiensis* y una protoxina de 130 kD, que al pasar al intestino es solubilizada debido al pH alcalino del medio. Esta es hidrolizada en fragmentos tóxicos de aproximadamente 650 aminoácidos (60- 70 kD) por acción de una proteasa, presente en el intestino medio. La subunidad proteica tóxica se une posteriormente a receptores específicos de las células columnares en la membrana epitelial del intestino medio de los insectos, causando un incremento de la permeabilidad de las membranas al ion K^+, seguido por la lisis celular del epitelio. Tras la lisis de las células epiteliales, cuyo efecto puede bastar para matar al insecto, las esporas contenidas en el intestino pueden acceder a la cavidad hemocélica del insecto aprovechando las lesiones como puerta de entrada, provocando en ocasiones septicemia al germinar y multiplicarse activamente en la hemolinfa, lo que supone un efecto sinérgico con el de la

toxina. Como consecuencia de esto, las larvas dejan de alimentarse y se provoca la muerte de la larva a las 24 ó 48 horas, después de la exposición.[25, 84]

FORMULACIONES DE *Bacillus thuringiensis.*

Una formulación de un pesticida agrícola se define como una mezcla o combinación correcta, de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto estable, efectivo, seguro, fácil de aplicar y aceptable para su uso. El objetivo principal de una formulación es asegurar la viabilidad óptima del entomopatógeno en el ambiente, extender la vida de anaquel del producto y ser aceptado por el insecto blanco. Dentro de los plaguicidas, los entomopatógenos son usados en las formulaciones como un ingrediente activo, el cual llevará a cabo el control biológico. Estos entomopatógenos pueden ser bacterias, hongos o virus, los cuales infectan a insectos.[85]

La microencapsulación es una tecnología relativamente nueva que es usada para la protección, estabilización y la lenta liberación de los ingredientes activo.[15, 85] Durante la microencapsulación, se forman gotas pequeñas del ingrediente o material activo que están cubiertas por un agente encapsulante, lo que resulta en la producción de cápsulas minúsculas con diversas propiedades favorables. Estas partículas esféricas, llamadas microcápsulas, presentan radios desde fracciones de micra hasta algunos milímetros. Sin embargo su forma no es siempre idealmente esférica, ya que está influenciada fuertemente por la estructura del material original;[76] los procesos de encapsulación son capaces de reducir la cantidad de ingrediente activo, de tal forma que se obtenga una eficiencia mayor. Este proceso permite llevar a cabo la liberación sostenida del ingrediente activo por un periodo de tiempo.[86]

El desarrollo de formulaciones mejoradas puede incrementar la mortalidad larvaria, asegurando la ingestión de una dosis letal de *B. thuringiensis* en un periodo de tiempo corto antes de que la larva deje de alimentarse, y la adición de coadyuvantes para estimular la alimentación de la larva sobre los productos de *B. thuringiensis* a sido una estrategia muy utilizada en agricultura. El uso de *B. thuringiensis* en cápsulas o gránulos con fagoestimulantes, ayuda a asegurar que la larva ingiera una cantidad letal antes de dejar de alimentarse.

Bacillus thuringiensis es solamente uno de los bioinsecticidas producidos a escala industrial y disponibles en el mercado a precios accesibles para los agricultores, sin embargo, *B. thuringiensis* aún es caro en comparación con los insecticidas químicos, para esto la tecnología de producción podrían ayudar a reducir los costos de manufactura, así como el realizar investigaciones básicas para mejorar los procesos de control de calidad, desarrollar de insecticidas basados en diferentes cepas de *B. thuringiensis*, desarrollar de nuevas formulaciones etc.

Las investigaciones de los últimos 25 años han demostrado la efectividad de las cepas de *B. thuringiensis* contra un gran número de cultivos agrícolas y ornamentales, árboles forestales y animales.

Varias formulaciones de *B. thuringiensis* están ahora registradas en los estados Unidos y Canadá. Formulaciones comerciales de la cepa HD- 1 de la variedad kurstaki, incluyendo a Thuricide, Depilé, Novaba, Futura, Envirobact, y Bactospeine son designadas específicamente para su uso contra ciertas plagas de lepidópteros de bosques, cultivos agrícolas, granos almacenados, ornamentales o jardines caseros. Otro producto es el Javelin el cual es una formulación de la cepa NRD- 12, especifica contra lepidópteros. Formulaciones de la variedad israelensis, como Vectobac, Bactimos y Teknar son usadas para el control de mosquitos y del mosquito negro. Entre otras

formulaciones comerciales destacan M- One y Trident, las cuales presentan como ingrediente activo a las variedades San Diego y Tenebrionis, respectivamente, llevando a cabo control contra ciertos coleópteros Chrysomélidos.[81] Algunas formulaciones pueden contener 2 o mas combinaciones de toxinas en un mismo producto para obtener un espectro de acción mas amplio. Mycogen recientemente introdujo una combinación de CryIAc y CryIC para cultivos de vegetales y Ecogen saca un producto llamado Crymax que posee tres toxinas Cry1Ac, Cry2A y CryIC (R) para utilizarse en cultivos de vegetales y de algodón. Algunas cepas de *B. thuringiensis* contienen 4 o más cristales. El Dipel de Abbott y Javelin de Sandoz son dos ejemplos. El número de cristales en un producto es solamente parte de su efectividad, la concentración es también un factor importante; el CoStar es un nuevo producto de alta potencia de *B. thuringiensis* introducido por Sandoz en 1996 para plagas de algodón y vino, contiene 5 cristales, incluyendo un alto nivel de Cry1Ac. La alta potencia ofrece un control efectivo de plagas a dosis bajas con gran actividad residual.[15]

La eficiencia o la toxicidad limitada de *Bacillus thuringiensis* es debido al lavado por las lluvias e inactivación de las esporas y cristales por acción de la luz solar. La futura transmisión de la infección a insectos es pobre o no existente, por esto es necesario las costosas aplicaciones repetitivas, especialmente para especies multivoltinas o especies con períodos de ovoposición largos. Sin embargo con el creciente reconocimiento del potencial de *Bacillus thuringiensis* como agente de control de insectos, los cambios de reducción de las limitaciones llegaron a ser el principal objetivo mundial de las formulaciones durante la década de los 80.[25]

Para aumentar el tiempo de persistencia del ingrediente activo en campo es necesario protegerlo de los factores adversos del medio ambiente y hacerlo mas atractivo al insecto blanco. Una forma que ha contribuido a proteger el ingrediente activo, ha sido

el empleo de formulaciones encapsuladas de lenta liberación, entre las cuales destacan las matrices de almidón, en forma de microcápsulas o gránulos, dependiendo si el método de aplicación es por aspersión, el cual se emplea para la mayoría de los cultivos; o granular, la cual se indica para gramíneas y pastos. [53, 55]

Los tipos de aplicación de *Bacillus thuringiensis* a cultivos se ha modificado notablemente en los últimos años, en un intento para aumentar la toxicidad, el número de insectos blanco a controlar y la residualidad del mismo. Inicialmente y hasta fechas recientes, se realizaba la aplicación del ingrediente activo en forma líquida por aspersión.[44.]

Aspersiones aéreas contra el gusano de la yema del abeto, *Christoneura rumiferana* y la polilla gitana *Lymantria dispar*, se realizaron en Norteamérica durante la década de los 70. Aplicaciones de campo se realizaron, enfocadas a determinar frecuencias de los tratamientos, dosis y volúmenes de aplicación. Con estas pruebas la eficiencia de *Bacillus thuringiensis* fue mejorando y disminuyendo los costos de aplicación. La tecnología para la aplicación de *Bacillus thuringiensis* es básicamente la misma que para los insecticidas sintéticos y están basadas en la aplicación controlada de las gotas. El principio de este concepto, el cual fue desarrollado en Inglaterra a finales de los 70, es que el tamaño óptimo de la gota asperjada es determinado por la naturaleza del cultivo blanco y otras consideraciones de aplicación relevantes. El concepto de gota controlada, fue aplicado en la aspersión forestal aérea por el Instituto de Tecnología y la Comisión Forestal del Reino Unido en Escocia, en pruebas con Fenitrotión para el control de la mariposilla bella del pino *Panolis flammea* y después por el Grupo de Investigación de New Brunswich para optimizar el control del gusano de la yema del abeto, en Canadá, donde el diámetro medio de la gota asperjada fue de 100 µm, tratándose aproximadamente 5 millones de hectáreas entre 1985 y 1990. En Canadá el porcentaje

de áreas tratadas con *Bacillus thuringiensis* ha aumentado de un 5% a un 60% de 1980 a 1990.[25]

En los últimos 20 años diversos estudios se han dirigido hacia la protección de las esporas y cristales, de la luz solar y en preparar formulaciones que fluyan fácilmente, se dispersen rápidamente y se almacenen bien. Formulaciones asperjables a base de almidón de maíz, las cuales contenían un 6% de sólidos totales fueron probadas, analizando ciertos factores físicos como viscosidad, solubilidad y retención sobre la superficie de la planta. Así también sé probo la persistencia de la actividad insecticida de *Bacillus thuringiensis,* observando que la actividad insecticida persistía hasta por dos semanas bajo condiciones de invernadero, cuando el agente encapsulante estaba presente. [53]

Durante los años de 1960, Angus y Jaques- Fox, experimentan el uso de aditivos aspersores y adherentes para incrementar la eficiencia de aspersión de *Bacillus thuringiensis* en sistemas de cultivo, donde la eficiencia sé incremento.[17]

En el campo, las aplicaciones microbianas, tanto operacionales como experimentales son aspersiones foliares, por lo que se pierde gran parte del agente en el suelo o aire, motivo por el cual se empezaron a emplear estabilizadores o adherentes.[17] Resultados positivos fueron observados al usar adherentes, entre los cuales se emplearon carbohidratos, destacando la sacarosa.[56] Otro de los problemas, es el daño que ocasionan los rayos solares del rango U. V., por lo que se investigaron diferentes colorantes que ayudaron a protegerlo de dichos efectos, sobresaliendo el rojo congo[7]; y para incrementar el consumo por parte del insecto, se adicionaron estimulantes como feromonas, siendo una buena opción el uso del p- metoxicianoaldheido,[56] o fagoestimulantes, resultando el Coax el más efectivo.[55]

Morales Ramos en 1996, demostró que los polímeros gelatina y pectina pueden

ser utilizados exitosamente para elaborar formulados granulares de *Bacillus thuringiensis*, el cual mantiene su actividad biológica, como también sus formulados poseen excelentes propiedades de adherencia, así también *B. thuringiensis* puede sobrevivir el procedimiento de atrapamiento y las larvas de *Trichoplusia ni* aceptan alimentarse con los gránulos elaborados con estas matrices poliméricas. Los formulados a base de pectina, gelatina y almidón al almacenarse por periodos de 12 meses, no mostraron pérdida considerable del porcentaje de actividad tóxica. En base a las propiedades que presentan estos biopolímeros, podrían utilizarse en otros tipos de formulaciones, ya que su elaboración no involucra el uso de solventes y además podría mejorar las propiedades adherentes de las mismas. Así también se determinó por medio de pruebas de aceptabilidad de varias formulaciones, que los gránulos de gelatina y pectina fueron mayormente preferidas por larvas de *Trichoplusia ni*.[56, 57]

Bacillus thuringiensis es el agente de control biológico más popular, con venta en 1995 de 90 millones de dólares, con 67 productos registrados y más de 450 usos y formulaciones, esperándose un incremento para el 2000 de cerca de 150 millones de dólares.[51]

El surgimiento de *Bacillus thuringiensis* como bioinsecticida necesitó de varias disciplinas aparte de la biología molecular, tales como el aislamiento de cepas, tecnologías de producción, técnicas de campo, formulación, etc., encaminadas a controlar un número importante de plagas del orden lepidóptera. [16]

La mayoría de los bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* son producidos con cepas nativas y utilizan una pequeña fracción de proteínas Cry conocidas.[90]

Los productos a partir de *B. thuringiensis* son clasificados según la fuente de las proteínas cry en 3 grupos: productos de primera, segunda y tercera generación.

- **Productos de primera generación.**

Son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de una cepa nativa de *B. thuringiensis* Constituyen la mayor proporción de productos comerciales y corresponden al 84% de un total de 75 productos registrados. Estos productos están disponibles en varias diferentes formulaciones tanto sólidas como liquidas y son empleadas en una amplia gama de sectores que van desde la agrícola, hasta el sector salud y zonas urbanas.

Los productos que utilizan *B. thuringiensis* serovar. *israelensis* (Bti) para el control de mosquitos y mosca negra son empleados ampliamente en el mundo y algunos ejemplos de productos registrados a base de Bti son: Vectobac® y Skeetal® (Abbott), Bactimos® (Solvay) y Tecknar® (Termo Trilogy).

En el sector agrícola han sido utilizados productos a base de *B. thuringiensis* en cultivos de trigo, maíz, algodón, frutales, sorgo y soya, entre otros, casi exclusivamente para el control de plagas de lepidópteros filófagos. Aunque su uso es limitado comparado con los insecticidas convencionales, existe un creciente interés en el manejo integral de plagas debido a un menor riesgo de desarrollo de resistencia, a políticas nacionales sobre el uso de pesticidas convencionales y a los altos costos de desarrollo de nuevos insecticidas sintéticos. [15]

COMPAÑÍA	NOMBRE COMERCIAL	VARIEDAD	BLANCO	PROTEÍNAS	PRESENTACIÓN	USO
Abbott Labs (Valent Biosciences Co)	Dipel, Biobit XL, Foray	kurstaki	Lepidóptera	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo seco, granulado, emulsión suspensión, polvo humectable, liquido concentrado	Jardín, forestal, invernaderos, hortalizas, plantas ornamentales
	Gnatrol, Bactimos, VectoBac	Israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Granulado, suspensión acuosa, polvos, pellest.	Lagos, agua estancada, salud publica, canales
	DiTera	Tenebrionis	Coleópteros	3Aa3	Concentrado acuoso	Protección de cultivos, papa, tomate, forestal, plantas de ornato
	Florbac	Aizawai	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1	Polvo humectable	Protección de cultivos
	Xentari	Aizawai	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1	Granulado humectable	Hortalizas, invernadero, frutales.
	Futura	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
All Union Instl Agr. Microbiol.	DibAeta	N.D.	N.D.	β exotoxina	Suspensión acuosa	N.D.
	Biotoxsbacillin	N.D	N.D.	β- exotoxina	Suspensión acuosa	N.D.
American Cyanamid	Acrobe	Israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1,11Aa1, CytAa	Suspensión acuosa	Salud publica
Bactec	Berman Bt	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1,, 2Ab1.	Polvo humectable, granulado, polvo seco	Invernadero, productos almacenados
Biochem. Products	Bactmos	israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Granulado humectable, suspensión acuosa	Salud publica
Chamapol-Biokma	Bathurin	Thuringiensis	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable, gránulos	Protección de cultivos
	Bactis	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa, 2Ab1	Suspensión acuosa, polvos humectables, granulado	Salud publica
Compagnia di Ricerca chim. CRC	Bactucide	Kurstaki	Israelensis	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Polvo humectable, liquido concentrado	Forestal, jardín, protección de cultivos, campos de golf, productos almacenados, salud publica
	Exobac	N.D.	N.D.	β- exotoxina	Suspensión acuosa	N.D.
Farbwerbe-Hoechst	Biospor	kurstaki	Lepidópteros	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B.	Polvo asperjable	Protección de cultivos
Fermenta ASC Co.	Cuttlas	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B.	Polvo humectable	hortalizas
Farmos	Muscabac	Thuringiensis	Lepidópteros	β-exotoxina	N.D.	N.D.
Glavmikro-	Dendrobacillin	Dendrolimus	Lepidópteros	N.D.	Polvo, pellest	Protección de cultivos

bioprom	Endobacterin	Galleriae	Lepidópteros	1Cb1	Polvo humectable	Protección de cultivos
	Eksotoksin	Tolworthi	N.D.	β- exotoxina	N.D.	N.D.
	Insektin	Thuringiensis	Lepidópteros	1Ba1	Polvo	Protección de cultivos
	Toxobakterin	Tolworthi	N.D.	β-exotoxina	N.D.	N.D.
Huazhong Agricultural University	Mianfeng pesticide	Ybt-1520	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Frutales, algodón, maíz, hortalizas
	Shuangdu preparat	Chinesensis Ct-43	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Forestal, algodón, jardín, maíz
	JieJueling preparat	Israelensis 187	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	N.D.	Agua residual, drenajes
	MieJueling preparat	Israelensis 187-cs8	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1	N.D.	Agua estancada, arroz
ICI Americas, Inc.	Ecodart	N.D.	N.D.	N.D.	Polvo, pellest	N.D.
Jewin- Joffe Industry Limited	Bitayon	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Protección de cultivos
Knoll Bioproducts	Larvo-Bt	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Korea Explosives	B.t	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo asperjable, polvo humectable	Protección de cultivos
Kyowa- Hakko Kogyo Co.	Selectgyn	Aizawai	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1	Polvo humectable	Protección de cultivos
LIBEC	Sporine	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Merck	Agritol	N.D.	N.D.	N.D.	Polvo asperjable	N.D.
Mycogen	M-One	Tenebrionis	Coleópteros	3A	Solución asperjable	Protección de cultivos
	M-Peril	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Forestal, jardín, papa
Novo Nordisk (Valent Biosciences Co)	Biobit	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
	Foray	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Forestal, campo de golf
	Novodor	Tenebrionis	Coleopteros	3A	Polvo asperjable	Protección de cultivos
	Skeetal	Israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Solución acuosa, briquetas	Salud publica
Nor- Am Chemical	SOK	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Phillips Duphar (Valent Biosciences Co)	Bactospeine	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable, polvo asperjable	Protección de cultivos, plantas ornamentales, invernadero
	Bactimos	israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Polvo seco, briquetas, polvo humectable	Salud publica, canales. Agua residual.

Procida	Plantibac	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Radonja	Baturad	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Protección de cultivos
	Nubilacid	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Salud publica
Scientific & Technology Developing	Bt 8010, Rijin	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas, algodón, frutales, arroz, plantas ornamentales
SDS Biotech K.K	Delfin, Thuricide	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas, forestal
Thermo Trilogy Corporation	Able	Kurstaki	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas
	Teknar	Israelensis	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Liquido concentrado	Lagos, pozos, riveras, agua estancada
	Thuricide	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Hortalizas, forestal
	Javelin, Delfin	Kurstaki-SAH	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Forestal, hortalizas, protección de cultivos
	CoStar	Kurstaki-SA12	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Frutales, forestal, protección de cultivos
	Steward	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Trident	Tenebrionis	Coleópteros	3Aa1	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Vault	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Shionogi Co.	Bacillex	Thuringiensis	Lepidópteros	β- exotoxina	N.D.	N.D.
Thompson Hayward	Bactur	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo asperjable, granulado	Salud publica, protección de cultivos
Towagosei Chem.	Taoro, Taoro-Ct	Kurstaki	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo, granulado	Protección de cultivos
Tuticorin Alkali Chemical and Fertilisers Limited	Spicturin	Galleriae	Lepidópteros	1Cb1	Liquido concentrado	Col, repollo, coliflor

- **Productos de segunda generación.**

Son aquellos constituidos por una mezcla de esporas y cristales provenientes de una cepa de *B. thuringiensis* a la cual se introdujo, por conjugación o transformación, los genes que codifican para las δ endotoxinas de genes presentes en varias cepas nativas, ampliando así su espectro de actividad hacia otros insectos plaga.

Los productos a partir de cepas de *B. thuringiensis* modificadas genéticamente involucran una serie de manipulaciones que incluyen: curación de plásmidos, conjugación, transformación recombinación especifica de sitio, mutagénesis in vitro y construcción de proteínas híbridas.

La manipulación de genes cry en *B. thuringiensis* ofrece un gran potencial en le mejora de la efectividad y la relación coste- beneficio de los productos a partir de *B. thuringiensis.* Se ha descrito que ciertas combinaciones de proteínas exhiben una actividad sinérgica hacia plagas de insectos lepidópteros[45] y Dípteros.[18]

El desarrollo de vectores de clonación para *B. thuringiensis* ha hecho posible la construcción de cepas mejoradas de *B. thuringiensis.* El uso de cepas de *B. thuringiensis* como huésped ofrece varias ventajas. Las cepas nativas pueden mantener, de forma estable y expresar eficientemente, varios genes homólogos de toxinas de *B. thuringiensis.* La capacidad para mantener múltiples genes Cry de *B. thuringiensis* en un mismo huésped mejora la actividad en una forma aditiva o sinérgica. Por otra parte, múltiples genes Cry con diferentes modos de acción o diferentes propiedades de unión al receptor pueden reducir la posibilidad de desarrollo de resistencia.[89]

Existen productos a base de cepas de *B. thuringiensis* transconjugantes. Para la obtención del ingrediente activo de productos Condor® y Cuttlas®, un plásmido autotransferible que porta un gen Cry1A de una cepa de la serovar. aizawai fue transferido por conjugación a una cepa receptora de la serovar. kurstaki y un plásmido que contiene un gen Cry1 de una cepa de la serovar. kurstaki fue transferido a una cepa de la serovar. aizawai. El ingrediente activo del producto Foil® OF, cepa EG2424, produce las proteínas Cry1Ac y Cry3A, presentando toxicidad contra plagas de lepidópteros y coleópteros; esta expansión en el espectro de huéspedes fue lograda por la

transferencia de un plásmido portador del gen Cry3A de morrisoni a una cepa de la serovar. kurstaki.[30]

El rendimiento en la producción de la proteína Cry3A se ha incrementado por el uso de cepas modificadas genéticamente. Las cepas de *B. thuringiensis* empleadas para producir Novodor ® y Foli® (variante de EG2424) tienen un fenotipo oligoesporogénico y producen cristales romboédricos inusualmente grandes, compuestos principalmente de la proteína Cry3A. La sobreproducción de la proteína Cry3A de estas cepas parece estar causada, en parte, por la naturaleza independiente de la expresión de la proteína respecto a la esporulación.[8] En el caso de Novodor®, cepa NB176, el incremento en la producción se debe probablemente a la duplicación del gen Cry3A sobre un plásmido nativo.[1] De esta clase de productos se conocen 9 que representan un 12% de los producidos por las empresas Abbot, Ecogen y Termo Trilogy Co.[15]

COMPAÑÍA	NOMBRE COMERCIAL	VARIEDAD	BLANCO	PROTEÍNAS	PRESENTACIÓN	USO
Abotts Labs (Valent Biosciences Co)	Novodor	Tenebrionis NB176	Coleópteros	3Aa3	Concentrado acuoso	Protección de cultivos, papa, tomate, forestal, plantas ornamentales
Ecogen Inc.	Leptinox (R)	Kurstaki ED7826	Lepidópteros	1Aa, 1Ac, 2A, 1F-1Ac (R)	Granulado, granulado humectable	Protección de cultivos, maiz dulce, césped
	Crymax	Kurstaki ED7841	Lepidópteros	1Ac, 2A, 1C (R)	Granulado, granulado humectable	Hortalizas, plantas ornamentales
	Raven	Kurstaki ED7673	Coleópteros	1Ac, 2A, 1C (R)	Polvo humectable	Papa, tomate
	Condor	Kurstaki	Lepidópteros	Transconjugante	Emulsión suspensión	Forestal
	Cuttlas (T)	Kurstaki	Lepidópteros	Transconjugante	Polvo humectable	Hortalizas
	Foil OF	Kurstaki EG2424	Lepidópteros	1Ac, 3Aa (T)	Polvo humectable	Protección de cultivos
	Foil BFC		Coleópteros		Polvo humectable	
Termo Trilogy Co.	Agrre	Aizawai GC91	Lepidópteros	Transconjugante	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Design	Aizawai	Lepidópteros	Transconjugante	Granulado humectable	Hortalizas

- **Productos de tercera generación.**

Han sido desarrollados con el objeto de resolver las limitaciones de una inadecuada aplicación y de su corta toxicidad residual.

Son aquellos cuya formulación contiene bacterias recombinantes muertas, consistentes en *Pseudomonas fluorescens* que han sido transformadas con genes que codifican δ- endotoxinas de *B. thuringiensis*. Este tipo de producto se conoce con el nombre de CellCap.[31] Solamente se conocen actualmente 3 productos de este tipo, los cuales representan el 4% del total de productos de B. thuringiensis y son elaborados por la empresa Mycogen.[15]

Estos productos se obtienen insertando los genes que codifican para las toxinas de *B. thuringiensis* en otros microorganismos, los cuales son capaces de colonizar los hábitat del insecto objeto de tratamiento, con la idea de que los organismos transformados puedan sintetizar de forma continua cantidades suficientes de toxina para prevenir el daño causado por el insecto. La aplicación de esta técnica se llevo a cabo en varios estudios en los cuales se insertaron genes específicos contra lepidópteros, dípteros y coleópteros en bacterias que colonizan externamente la superficie de las hojas y raíces de las plantas, tales como *Pseudomonas cepacia* y *Ps. fluorescens*.[75] o internamente tales como *Clavibacter xyly, Rhizobium leguminosarum* y *Bradyrhizobium* .[74]

El inconveniente de esta técnica se encuentra en que involucra la liberación de microorganismos recombinantes, lo cual presenta numerosas restricciones de regulación de empleo. Una de estas restricciones consiste en la posible inestabilidad de la característica que se introduce, como por ejemplo, que los genes insertados se transfieran a otras especies bacterianas. Una estrategia que permitió el empleo de estos productos consistió en utilizar microorganismos recombinantes muertos, para obtener un nuevo sistema de utilización de la toxina.[31] Mycogen ha utilizado esta estrategia encapsulando varias toxinas de *B. thuringiensis* dentro de células de *Ps. fluorescens*.

Este sistema se denomina CellCap®, y consiste en matar las células transformadas durante la fase estacionaria de crecimiento.

COMPAÑÍA	NOMBRE COMERCIAL	VARIEDAD	BLANCO	PROTEÍNAS	PRESENTACIÓN	USO
Mycogen	Match®	Pseudomonas (EC)	Lepidópteros	Encapsulado	Encapsulado	Protección de cultivos
	Mtrak®	Pseudomonas (EC)	Coleópteros	3A (encapsulado)	Encapsulado	Forestal, jardín, papa
	MVP®	Pseudomonas (EC)	Lepidópteros	Encapsulado	Encapsulado	Forestal, jardín, papa.

INSECTO BLANCO (*Diatraea saccharalis*):

El barrenador del tallo *Diatraea saccharalis* es la plaga más importante de la caña de azúcar y está ampliamente distribuida. Esta larva puede atacar aparte de la caña de azúcar, a los cultivos de arroz, maíz, sorgo y pastos. El ciclo de vida del insecto es corto y se pueden completar de 4 a 5 generaciones anualmente. La larva pasa el invierno en los residuos de los cultivos, por lo que es importante un manejo adecuado de los mismos (quemarlos o hacerlos polvo).[20]

Los huevos son puestos en filas yuxtapuestas de 1-10 en las hojas terminales. Son aplanados y ovalados, los cuales recién puestos son transparentes, pero después de 2 días presentan bandas rojas. Las larvas son cremosas con puntos negros o café en cada segmento; en diapausa las larvas no presentan los puntos negros. Asimismo, las larvas presentan un escudo protoráxico café amarillento. Las larvas pueden llegar a medir hasta 25 mm de largo. Los adultos son cremosos o gris claro y miden de 20 a 40 mm con las alas extendidas. En descanso, los adultos tienen la forma de un triángulo.[29, 68]

Cada hembra deposita entre 300 y 400 huevos sobre el envés de las hojas, los cuales eclosionan después de 7 a 10 días. Las larvas pasan por 7 instares, donde en los dos primeros llevan a cabo su alimentación destruyendo las hojas del cogollo, y cuando ya están más desarrolladas se dirigen hacia la parte inferior de la planta donde barrenan los entrenudos y destruyen los tejidos internos formando galerías.[39]

Las larvas jóvenes se alimentan inicialmente del cogollo y de las hojas tiernas por un espacio de 2 ó 3 días después de la eclosión, antes de entrar al tallo al cual taladran haciendo uno o más agujeros. Las larvas viven en el túnel hecho como producto de su alimentación. Los túneles en los entrenudos de los tallos pueden reducir el vigor de la planta y causar acame. La pudrición roja de la caña ocasionada por *Colletotrichum graminicola* está asociada frecuentemente con estos túneles. En maíz, el daño de larvas grandes antes de la floración matan el cogollo o la yema apical de la planta, y después de la floración puede matar el elote o panoja. En ciertas ocasiones, las larvas barrenan directamente en las mazorcas y permiten la entrada de otros organismos dañinos, lo que puede resultar en la pudrición del grano. En caña de azúcar el extracto de jugo es afectado, y en arroz impide que la panícula madure y el grano se llene. Son plagas esporádicas, pero el daño es más severo en postrera, o sea, cuando ocurre la tercera generación del año. El tiempo que la plaga dura en su estadío larvario es de 20 a 30 días. Las larvas pupan e invernan dentro del tallo. Durante la época seca, las larvas entran en un período de diapausa y están inactivas hasta las primeras lluvias. Esta plaga es de moderada o menor importancia. La severidad del daño depende de la edad, el vigor de la planta y época de siembra.[20] Su distribución se localiza en la parte meridional de los EE.UU., México, Antillas, América Central, América del Sur[93], y específicamente en México, el gusano barrenador del tallo de la caña de azúcar (Lepidóptera: Pyralidae) se encuentra distribuido en todas las áreas donde se siembra estas gramíneas, como en los

estados de Sonora, Sinaloa, Colima, Jalisco, Nayarit, Michoacán, Tamaulipas, San Luis Potosí, Guerrero, Morelos, Durango, Oaxaca, Puebla, Veracruz, México, Quintana Roo, Campeche y Yucatán[22], sin embargo, solo en dos lugares alcanza niveles de daño muy importantes, los cuales están representados por Sinaloa y Tamaulipas.[22]

DAÑOS OCASIONADOS

En México, el gusano barrenador del tallo de la caña de azúcar (Lepidóptera: Pyralidae) se encuentra distribuido en todas las áreas donde se siembra esta gramínea, sin embargo, solo en dos lugares alcanza niveles de daño muy importantes, los cuales están representados por Sinaloa y Tamaulipas. [22] Los ingenios de Sinaloa presentan índices de daño que varían del 15% al 30% de los entrenudos barrenados, lo que ocasiona pérdidas de 2 a 10 toneladas de caña por hectárea.[22]

Se estima que por cada larva de Barrenador por planta, si el ataque se produce en el período de llenado de granos de maíz, puede disminuir el rendimiento del 22 al 55% e incrementarse más aún en condiciones de sequía. Los barrenadores del tallo causan daño a plantas de maíz, principalmente en las zonas costeras tropicales y subtropicales del país, donde se han reportado pérdidas globales a nivel nacional del 10 al 20%.[22]

Los daños que ocasionan las larvas al barrenar los entrenudos, crean como consecuencia un debilitamiento de la planta la cual se puede quebrar con el viento y dejar la mazorca expuesta a ser devorada por roedores u otros mamíferos. En ocasiones las larvas pueden barrenar la mazorca y favorecen la entrada de patógenos.

Cuando el ataque es muy temprano, afecta el punto de crecimiento las plantas y los tallos se distorsionan y "amacollan" por lo que las plantas no crecen ni llegan a producir. Se ha determinado que el daño directo básico causado por los barrenadores en

plantas que logran desarrollarse, no disminuyen los rendimientos aunque el daño sea espectacular. [28]

La caña de azúcar es el segundo cultivo de mayor valor e importancia dentro de la economía agrícola de Colombia (45% de todos los cultivos; Ocampo 1993;). En la región de Cauca más de la mitad del área superficial es plantada de caña de azúcar (64,000 ha). El barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*, es la principal plaga agrícola de la caña de azúcar. Las pérdidas anuales generadas solo en la región del Valle de Cauca son estimadas en 53.4 millones de pesos colombianos.[29]

CAÑA DE AZÚCAR: PARTICIPACIÓN DENTRO DE LA ECONOMÍA.

En la economía mexicana, la industria azucarera, por sus características, se inscribe como una de las principales generadoras de empleo regional, lo que la inserta en un complicado contexto de intereses económicos, políticos y sociales. La agroindustria de la caña de azúcar en México por su naturaleza, se ubican en zonas rurales del campo mexicano, generando más de 300,000 empleos vinculados con la actividad y más de 150,000 asociados con la vida de las respectivas comunidades, y cerca del 73% de ellos viven en zonas rurales, lo que quiere decir que la mayoría de la población que vive de esta actividad está arraigada a la tierra donde producen.[22] Su participación en la economía nacional dentro del producto interno bruto nacional se ha mantenido alrededor del 1%, en el sector manufacturero tiene una participación del 2.4% y en lo que respecta a la rama de alimentos y bebidas, es de 12.5%. La producción nacional de azúcar proviene principalmente del Estado de Veracruz, ubicándose en la entidad el 34% de los ingenios azucareros del país. Veracruz cuenta con 22 de los 65 ingenios que hay en el

país y genera más de 10 mil empleos. Actualmente Veracruz participa con el 47% de la producción nacional de caña de azúcar y con el 38% de la producción nacional de azúcar. Si comparamos la superficie sembrada contra superficie cosechada a nivel nacional, el rendimiento en campo por unidad de superficie son de alrededor de 71 ton/ha. en promedio; estos rendimientos son superiores a los de países como la India, Brasil, Cuba, Filipinas, y sólo están en promedio un 12% abajo de los rendimientos de países como Australia y Estados Unidos.[22]

Actualmente, México ocupa el segundo lugar mundial en el consumo per cápita de azúcar refinada con 46.1 kilogramos por habitante cada año, encontrándose entre los 10 principales productores y consumidores de azúcar a nivel mundial; este aumento corresponde al consumo del azúcar en su forma industrializada: refrescos, dulces, panes, etc. En 1993 su producción se ubicó alrededor de los cuatro millones de toneladas y su consumo en 3.8 millones de toneladas con una tendencia hacia la alza en los años siguientes. [22]

El Estado de Veracruz es el mayor productor de caña de azúcar y derivados, el cual cuenta con una población económicamente activa (P.E.A.) de 4'133,715 personas, equivalente al 60% de la población total del estado. De la P. E. A. en la entidad, el 5% lo absorbe la industria azucarera que equivale a 184,836 trabajadores adscritos a los ingenios y un total de 893,001 dependientes económicos del sector (13% de la población total del estado).[22]

ESTRATEGIAS DE CONTROL

Los daños efectuados por el barrenador son efectuados cuando la plaga se encuentra en el estadío larval, pudiendo atacar al cultivo durante todo su desarrollo. Para contrarrestar sus daños se han utilizado diversos métodos de control, incluyendo al químico, físico, mecánico, cultural, genético y biológico; sin embargo, hasta el momento no se ha podido disminuir esta plaga a niveles tolerables. [20]

Son muy diversas las estrategias seguidas para llevar a cabo el control de barrenador del tallo de la caña de azúcar en los cultivos de caña de azúcar y maíz. Las recomendadas en el manejo integrado de plagas son:

Control cultural

Las estrategias de este tipo de control llevados a cabo para controlar las poblaciones de *D.* saccharalis son: los rastreos y la destrucción de residuos inmediatamente después de la cosecha, así como la eliminación de gramíneas maleza en las orillas e interior del campo, lo cual abate la población de estos insectos en los campos de cultivo.

La destrucción de los rastrojos de maíz y sorgo durante la época seca, ya sea por incorporación o por quema, destruye las larvas en diapausa, aunque esta práctica también puede eliminar enemigos naturales. Las siembras tempranas y variedades precoces generalmente escapan de los ataques severos. La rotación de cultivos ayuda a bajar el inóculo en el campo. Evitar sembrar maíz, sorgo y arroz cerca de la caña de azúcar es una buena práctica. Una buena fertilización y densidad de siembra

minimiza el impacto de infestaciones de la plaga. Es preciso que se lleven a cabo estas prácticas a nivel regional. [20]

Control biológico

Aunque el control biológico en los trópicos tiene una historia larga y exitosa, poca es la información disponible en la literatura internacional. Los bajos costos laborales y los altos costos de los pesticidas importados han favorecido el desarrollo del control biológico aumentativo. En una revisión del control biológico llevado a cabo en las zonas neotropicales (citas mencionadas entre 1961- 1983), se identificó 163 casos de control biológico en 18 países, en donde han reportado el establecimiento[79]. La mayoría de esos casos fueron en cítricos (42%), otras frutas (16%), caña de azúcar (14%), y algodón (6%). Los países en los que se reportaron la mayoría de los casos fueron México, Perú, Chile, Argentina, Brasil, Guayana y Colombia. La taxas de insectos mayormente usados como enemigos naturales fueron parásitos del orden Hymenóptera (75%), Coleóptera (14%) y Díptera (7%).

Dentro de este tipo de control se contempla el empleo de enemigos naturales y organismos entomopatógenos. Una de las estrategias mas utilizadas es la liberación de *Trichogramma* sp., una avispa parásita de huevecillos.

De estos métodos de control, Box (1951) explica que el único medio de económico para combatir al gusano barrenador, es restableciendo el equilibrio entre la plaga y sus enemigos naturales, fomentando de esta manera la reproducción y liberación de parásitos dentro del control biológico. Al respecto, a partir de 1992 el ingenio de los Mochis suspendió totalmente la aplicación de insecticidas en el cultivo de caña de azúcar, lo que favoreció el incremento de las especies de parásitos nativos. Una de las especies nativas que se ha incrementado significativamente en los últimos años es *Conura acuta*

(Hymenóptera: Chalcididae), un parásito solitario interno de pupas del gusano barrenador.[20]

Trichogramma spp. (Hymenóptera: Trichogrammatidae) y *Telenomus alecto* (Hymenóptera: Scelionidae) son parasitoides de los huevos. Los parasitoides larvales *Apanteles diatraeae* (Hymenóptera: Braconidae) y *Billaea claripalpis* (Díptera: Tachinidae) ayudan en el control natural de la plaga, pero tienen un efecto mínimo, ya que las larvas y pupas están protegidas en los túneles. *Cotesia flavipes* (Hymenóptera: Braconidae), un parasitoide introducido a Centroamérica, es criado y liberado para el control de la plaga en cañaverales de Costa Rica, Panamá, Colombia, Brasil y México.[20, 28]

Sin embargo el uso de enemigos naturales presenta algunas desventajas, donde por lo regular son especies exóticas, las cuales no logran adaptarse a los sitios de liberación o bien no consiguiendo llevar a cabo el control al no lograr parasitar la plaga. Los niveles de parasitismo en el área costera de Kenya aún son bastante bajos, pero parece que están aumentando con el paso del tiempo. En Madagascar donde *C. flavipes* fue liberada contra *Chilo sacchariphagus* en caña de azúcar, los niveles máximos de parasitismo (60%) no se obtuvieron hasta 6 años después de las liberaciones. En Barbados, donde *C. flavipes* fue liberado en 1966 contra *Diatraea saccharalis* en caña de azúcar, no se pudo recuperar por más de un año después de las liberaciones a pesar de la intensidad de las exploraciones, pero luego el parasitismo se elevó sostenidamente durante los pocos años siguientes .[28]

Control químico

El control químico rara vez se justifica, sin embargo si la plaga alcanza el nivel crítico es conveniente hacer las aplicaciones de plaguicidas cuando las larvas aun estén pequeñas y antes que inicien sus barrenos.[48] Actualmente el único insecticida en

formulación emulsionable apto para pulverizaciones sobre el cultivo infestado por esta plaga, es la Deltametrina al 5%. Este producto es recomendado en dosis de 200 ml/ha en tratamiento ultra-bajo volumen (UBV) con 2-2,5 lt. de aceite agrícola. [63]

Debido a su hábito alimenticio, el control químico es deficiente una vez que la larva barrena el tallo. Por eso se recomienda hacer monitoreos de huevos y larvas pequeñas, ya que es la única etapa en que podemos controlar la larva. Se recomiendan productos de contacto o ingestión aplicados al follaje. Las aplicaciones dirigidas hacia el cogollo ayudan a reducir las poblaciones de los barrenadores. En caña de azúcar no se recomiendan las aplicaciones de insecticidas cuando se hacen liberaciones de enemigos naturales, ya que reducen sus poblaciones.[79]

Control Integrado

En caña se utilizan prácticas de control cultural y biológico en programas verdaderamente integrados. En maíz, sorgo y arroz, el uso de prácticas culturales es la clave para el manejo de la plaga, al igual que el uso acertado de los muestreos y las aplicaciones de insecticidas en los momentos oportunos.[81]

HIPOTESIS.

Es posible encontrar una cepa nativa de *Bacillus thuringiensis*, tóxica contra *Diatraea saccharalis* y desarrollar un formulado efectivo para su adecuada aplicación sobre cultivos de caña de azúcar.

OBJETIVO GENERAL.

Encontrar una cepa de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica contra *Diatraea saccharalis* y desarrollar un formulado efectivo para su adecuada aplicación en los cultivos de caña de azúcar y protegerlo del ataque de *D. saccharalis*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- Implementar la cría masiva de *D. saccharalis* en el laboratorio.

- Realizar ensayos preliminares en el laboratorio para medir la actividad tóxica de las diferentes cepas nativas y de colección de *B. thuringiensis* que se tienen en la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología de la F. C. B. U.A.N.L., contra larvas de *Diatraea saccharalis* en laboratorio.

- Obtención de la dosis letal media (DL_{50}) y tiempo letal medio (TL_{50}) de *Bacillus thuringiensis* para *Diatraea saccharalis.*

- Producción masiva de la cepa efectiva de *B. thuringiensis* a nivel planta semipiloto.

- Realizar bioensayos de preferencia para *D. saccharalis* utilizando diferentes matrices encapsulantes y aditivos fagoestimulantes solos o en combinación.

- Formulación del extracto de *B. thuringiensis* en forma de granulados y asperjables con la incorporación en el mejor soporte de formulación.

- Evaluar a nivel de laboratorio e invernadero los formulados desarrollados.

METODOLOGIA.

ESTABLECIMIENTO DE LA CRÍA MASIVA DE *Diatraea saccharalis* A NIVEL DE LABORATORIO.

Los ejemplares utilizados para establecer la cría de *Diatraea saccharalis* fueron proporcionados por la Dra. Jesusa C. Legaspi de la Texas Agricultural Experiment Station de la Texas A&M University.

Se implementó la cría de *D. saccharalis* utilizando la dieta artificial de Shorey. Dada la existencia de varias dietas específicas reportadas para la cría masiva de *Diatraea saccharalis* tales como Pan, Y. S. 1961; Wongsiri, T. 1962; Miskiem, G. W. 1965; Salama, H. S. 1967; Bailey, D. L. 1968; Hensley, S. D. 1968; Dinther, J. B. 1970; Mihm, J. A. 1984, por comparación con estas, se hicieron modificaciones a la dieta de Shorey. La cría se estableció a partir del estadio pupal. Las pupas obtenidas fueron sexadas y se colocaron en cubetas plásticas de 4 lts. de capacidad por separado, las cuales fueron cubiertas con gasa. Conforme los adultos fueron eclosionando se formó una colonia de adultos en cubetas plásticas de 4 lt de capacidad en donde se colocaron una proporción de 30 hembras y 20 machos. Las cubetas fueron revestidas con un soporte plástico de ovoposición sobre las paredes internas y base del contenedor y a su vez cubiertas con una tapa de gasa. Los adultos fueron alimentados con una solución azucarada al 10% proporcionadas en almohadillas de algodón humedecidas dentro de copitas plásticas, las que a su vez fueron cubiertas con una película plástica de polietileno, a la cual se le hicieron 4 orificios periféricos y 1 central de 2 mm aproximadamente por donde se extrajo

un pequeño mechón del algodón para la alimentación de los adultos. Los soportes plásticos de ovoposición fueron recuperados diariamente. Los huevecillos en el soporte fueron lavados con una solución de hipoclorito de sodio al 2%, se dejaron secar por espacio de 2 horas, y se desprendieron del soporte haciendo un doblez al plástico, el cual se hace deslizar para que las masas de huevecillos sean desprendidas. Los huevecillos fueron recuperados y se colocaron en una copita plástica de 4 cm de diámetro por 1 cm de alto, los cuales fueron colocados a su vez sobre una copa de 7 cm de diámetro por 3 de alto la cual contiene dieta artificial; esta copa se cubre con una tapa de cartón y pasaron a ser incubados. Una vez que los huevecillos adquirían la característica de cabeza negra se les cambió la tapa a la copa por una plástica. Posteriormente al eclosionar las larvas se formó la colonia de larvas, utilizando copas plásticas cristalinas con dieta, en la cual se colocaron 15 larvas por copa y pasaron a ser incubadas. Aproximadamente a los 12 o 15 días se realizó un recambio de dieta y se continuó con el proceso de incubación. Al ir transformándose al estadío pupal, se llevó a cabo la colecta diaria y el sexado de las mismas. Las pupas fueron colocadas por sexos en recipientes plásticos de 4 lt de capacidad. A partir de esta etapa se reinició un nuevo ciclo del insecto, para crear una nueva generación. Conforme se implementó la cría del insecto, se establecieron las condiciones operacionales óptimas para la cría de manera masiva de 27°C, un fotoperíodo de 12/ 12 hrs. luz, y una atmósfera de 70- 80 % de humedad relativa.

EVALUACIÓN PREELIMINAR DEL EFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS ESPORA- CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis.*

Para seleccionar una cepa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica contra *D. saccharalis* se probaron cepas nativas y de colección, mediante bioensayos de

incorporación a la dieta bajo las dosis de 50 y 500 μg de extracto de *B. thuringiensis* por ml de dieta, utilizando larvas de *Diatraea saccharalis* de 2 días.

Para ello se obtuvieron los extractos espora- cristal de las diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* a probar. A partir del cepario de laboratorio mantenido en tubos con agar nutritivo inclinado, se inició la activación de la cepa de *Bacillus thuringiensis* en tubo con agar nutritivo inclinado, el cual se incuba por 18 hrs. A 30°C. A partir de la cepa activada en agar nutritivo, esta pasó a un medio de enriquecimiento en matraces de 250 ml con 50 ml de caldo triptosa fosfato (CTP), los cuales fueron incubados por 18 hrs. a 30°C y 200 r.p.m. de agitación. Posteriormente fueron inoculados 5- 8 matraces de 500 ml de capacidad con 100 ml de medio de cultivo a base de melaza, harina de soya, líquido de remojo de maíz y carbonato de calcio. Los matraces se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. a una temperatura de 30°C. Los matraces fueron monitoreados cada 6 horas, hasta observar el inicio de la esporulación. Una vez iniciada la esporulación el monitoreo se realizó cada 2 horas, hasta la aparición de un 80% de esporulación, tiempo en el que el proceso termina. A continuación el pH del medio de cultivo fue medido y ajustado en el rango 7.0- 7.2. El complejo espora- cristal se obtuvo por el método de lactosa- acetona (Dulmage, 1970), para ello el medio de cultivo se centrifugó a 10,000 r.p.m. por 30 minutos a 5°c y el pellet obtenido fue pesado. Se preparó una solución de lactosa al 5% en una proporción de 1.71 veces el peso del precipitado o pellet, la cual se adicionó al pellet y se inició un proceso de agitación en una base magnética a una velocidad media por espacio de 30 minutos. A continuación se adicionó 3.34 volúmenes de acetona en relación al peso del precipitado y el volumen de lactosa al 5% adicionado, continuando la agitación por 30 minutos más. Se realizó después el proceso de obtención del extracto espora- cristal de *Bacillus thuringiensis* mediante un proceso de filtración al vació. Finalmente el extracto fue pulverizado y almacenado.

Posteriormente los extractos de *B. thuringiensis* fueron incorporados a la dieta artificial bajo las dosis de 50 y 500 µg/ ml de dieta, la cual se dispersó en copas (25 copas para cada dosis). Después la dieta se dejó solidificar por espacio de 2 horas, se les transfirió una larva de *D. saccharalis* de 2 días de edad a cada copa y fueron tapadas; las 25 copas se depositaron en una bolsa de papel y se incubaron a 30°c y 80% de H. R. El bioensayo fue realizado por triplicado. Un total de 75 larvas se probaron por cada dosis para cada extracto de *B. thuringiensis.* La mortalidad se registró a los 7 días. Como controles se utilizaron copas con dieta sin extracto de *B. thuringiensis.* Los datos fueron reportados como porcentajes de mortalidad.

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (DL_{50}) DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA *D. saccharalis.*

De la o las cepas que presentaron una actividad tóxica mayor al 60% en contra de *Diatraea saccharalis*, se les realizó un bioensayo utilizando 8 concentraciones para determinar la dosis letal media (DL_{50}). Los extractos de *B. thuringiensis* fueron incorporados a la dieta artificial en las dosis de 10, 25, 35, 55, 65, 75, 85 y 100 µg/ ml y se dispersaron en copas (25 copas para cada dosis). Después la dieta se dejó solidificar por espacio de 2 horas, se les transfirió una larva de *D. saccharalis* de 2 días de edad a cada copa y se taparon; las 25 copas se depositaron en una bolsa de papel y se incubaron a 30°C y 80% de H. R. El bioensayo se realizó por triplicado, en días diferentes según la cepa. Un total de 75 larvas se probaron por cada dosis para cada extracto de *B. thuringiensis.* La mortalidad se registro a los 7 días. Como controles se

utilizaron copas con la dieta sin extracto de *B. thuringiensis*. Los resultados fueron analizados mediante un análisis probit y se selecciono la cepa más tóxica.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO LETAL MEDIO (TL_{50})

A la cepa que presentó la mayor actividad tóxica a una DL_{50} baja, se le determinó el tiempo letal medio contra *D. saccharalis* mediante un bioensayo de incorporación a la dieta, donde se adicionó el extracto de *Bacillus thuringiensis* a la dosis letal media (DL_{50}), determinado anteriormente. El extracto de *B. thuringiensis* incorporado a la dieta se disperso en copas (25 copas para cada dosis). Después la dieta se dejó solidificar por espacio de 2 horas, se les transfirió una larva de *D. saccharalis* de 2 días de edad a cada copa y se tapó. Las 25 copas se depositaron en una bolsa de papel y se incubaron a 30ºC y 80% de H. R. Un total de 150 larvas se ensayaron para el extracto de *B. thuringiensis*. La mortalidad se registro diariamente por espacio de 7 días consecutivos. Como controles se utilizaron copas con dieta sin extracto de *B. thuringiensis*.

PROPAGACIÓN MASIVA *B. thuringiensis*.

La cepa más efectiva contra *D. saccharalis* se propagó en un biorreactor New Brunswick Sc. Co. de 14 litros de capacidad con 7 litros de medio a base de melaza. El escalamiento del proceso se llevó a cabo primero activando la cepa en tubos con agar nutritivo inclinado por 18 horas a 30°C. A continuación se inocularon matraces de 250 ml

conteniendo 50 ml de caldo triptosa fosfato e incubaron por 18 horas a 30°c., transcurrido este tiempo se inocularon matraces de 500 ml con 100 ml de medio a base de melaza, harina de soya, carbonato de calcio y líquido de remojo de maíz. Después los tanques del biorreactor con 7 lts de medio a base de melaza, fueron inoculados al 1% con el medio melaza de los matraces de 500 ml. Los parámetros de fermentación que se utilizaron fueron 30°C, pH 7.1, 1 v.v.m. de aireación y 500 r.p.m. de agitación. (Galán Wong, 1993). Una vez iniciado el proceso, este fue monitoreado cada 4 horas tomando una alícuota del medio de cultivo para detectar el proceso de esporulación mediante una laminilla con tinción simple, midiendo además el pH del medio de cultivo. Una vez iniciado este, el intervalo de monitoreo se acortó a 2 y 1 hora. Al observar el 80 % de células en esporulación, se paró el proceso. El extracto fue obtenido usando el método de co-precipitación lactosa- acetona (Dulmage, 1970), mencionado con anterioridad.

BIOENSAYO DE PREFERENCIA ALIMENTICIA

Para hacer los bioensayos de preferencia para *D. saccharalis* se elaboraron soportes de formulación granulares a partir de pectina, gelatina, una mezcla de gelatina y pectina en proporción 1:1 y 1:2 como matrices encapsulantes, solos o en combinación con un aditivo fagoestimulantes como la melaza, polvo de maíz (panoja), polvo de zanahoria y coax, en una proporción del 4%. Los soportes se elaboraron sin extracto de *B. thuringiensis* por el método descrito por Morales et al., 1998. Los ingredientes sólidos fueron homogenizados mediante el tamizado de los mismos, e integrados mediante la adición mínima de agua, hasta formar una pasta, la cual se dejó reposar por 2 horas a temperatura ambiente. La pasta se hizo pasar a través de un tamiz malla # 20 por acción de presión. El material obtenido se pasó a través de un tamiz malla # 6 por acción

rotatoria. Se colectaron los soportes obtenidos y se secaron bajo una campana de flujo laminar por espacio de 16 hrs. Los soportes fueron almacenados en recipientes plásticos.

En total se elaboraron 20 tipos de soportes. La Tabla 1 muestra los diferentes tipos de soportes desarrollados.

Tabla 1.- TIPOS DE SOPORTES DISEÑADOS.

SOPORTE / FAGOESTIMULANTE	Pectina (Po)	Gelatina (Gl)	Gelatina: Pectina 1:1 (Gl:Po 1:1)	Gelatina : Pectina 1:2 (Gl:Po 1:2)
Coax (coa)	Po- coa	Gl- coa	Gl:Po 1:1- coa	Gl:Po 1:2- coa
Panoja (pan)	Po- pan	Gl- pan	Gl:Po 1:1- pan	Gl:Po 1:2- pan
Zanahoria(zan)	Po- zan	Gl- zan	Gl:Po 1:1- zan	Gl:Po 1:2- zan
Melaza (mel)	Po- mel	Gl- mel	Gl:Po 1:1- mel	Gl:Po 1:2- mel
s.f.	Po	Gl	Gl:Po 1:1	Gl:Po 1:2

Po= Pectina, Gl= gelatina, Gl:Po 1:1= gelatina: pectina 1:1, Gl:Po 1:2= gelatina: pectina 1: 2, coa= coax, pan= polvo de panoja de maíz, zan= polvo de zanahoria, mel= melaza y s.f.= sin fago estimulante

Para hacer el bioensayo de preferencia de alimentación para *D. saccharalis* se uso el método de dos alternativas descrito por Bartlet et al., 1990. Se utilizaron cajas petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una mezcla de pasta de París y carbón activado granulado en una proporción 15:1. Las cajas fueron humedecidas y se depositaron en sitios opuestos 25 mg del soporte a comparar, dejándolos hidratar por espacio de 1 hora. Se realizaron una combinación por pares de los soportes diseñados, para ello un tipo de soporte se enfrento con cada uno de los 19 soportes restantes. Un total de 210 pares de soportes fueron comparados y se realizaron 5 repeticiones para cada comparación. A cada caja con el par de soportes a comparar se le transfirieron 10 larvas de *D. saccharalis*

de 2 d, y se dejaron durante toda la noche bajo oscuridad a 30°C y 80% de H. R. Aproximadamente 24 horas después, las cajas fueron congeladas a –30°C y el número de larvas sobre cada sitio fue registrado. Los soportes de formulación elaborados fueron comparados enfrentándose, además contra trozos de caña de azúcar de 0.125 cm^3, como parámetro de comparación.

Los resultados fueron analizados por ANOVA.

FORMULACIÓN DE *Bacillus thuringiensis.*

Posteriormente se desarrollaron formulados granulares y asperjables con el soporte y aditivo más aceptado por *D. saccharalis,* usando *B. thuringiensis* al 7%.

Los formulados granulares se elaboraron de acuerdo al método reportado por Morales L., 1996. Los materiales sólidos se homogenizaron con el extracto de *B. thuringiensis* y posteriormente con la mínima cantidad de agua, se formó una pasta la cual se dejó reposar de 1 a 2 horas a temperatura ambiente y a continuación se hizo pasar a través de una malla # 20 por acción de la aplicación de presión y después a través de una malla # 6 por acción rotativa. Los formulados granulares se dejaron secar durante toda la noche en una campana de flujo laminar.

Para elaborar los formulados asperjables se utilizó el método descrito por De Luna S. E., 1998. Se prepararon soluciones de la matriz encapsulante al 2% en agua, en las cuales se dispersaron los aditivos al 4% y el extracto de *B. thuringiensis* al 7%. Las formulaciones asperjables elaboradas fueron secadas utilizando un secador por aspersión APEX modelo SSE68. Se armó el secador y se conectaron al panel de control, las

mangueras provenientes de los compresores de aire. El aparato fue encendido y se inició la inyección de la formulación asperjable a un flujo de alimentación de 6 ml/ min., una vez que las condiciones de secado por aspersión se regularon a una temperatura de la cámara de 130- 140°C, una temperatura de salida de 75- 85°C, 6 resistencias de calentamiento y una presión de aire para la aspersión de 3,600- 4,200 kPa/ cm^2. El polvo del formulado seco se colectó en frascos plásticos. Una vez secada la formulación se inyectó agua destilada durante 5 minutos para limpiar la manguera de alimentación y el atomizador centrifuga. Terminado el secado, el aparato sigue funcionando por 3 minutos más sin alimentación alguna, para tratar de disminuir la humedad relativa en los frascos de colecta. Los formulados asperjables secos fueron pesados y almacenados.

EVALUACIÓN DE LOS FORMULADOS A NIVEL DE LABORATORIO.

Una vez obtenidos los formulados se realizaron bioensayos en laboratorio para determinar la actividad tóxica de *B. thuringiensis* en los formulados.

Para los formulados granulares se utilizo el método reportado por Dunkle y Shasha, 1988. Para ello se utilizaron cajas petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una capa de la mezcla a partir de pasta de París y carbón activado 15:1. Se humedecieron las cajas y se colocaron en el centro 20 mg del formulado, el cual se dejó hidratar por espacio de 1 hora tapando el recipiente, posteriormente se expusieron 20 larvas de *D. saccharalis* de 2 días y se les dejó alimentarse sobre el formulado durante 24 horas. Para cada formulado se usaron 5 repeticiones. Además fueron evaluadas una formulación comercial a base de *B. thuringiensis* var. kurstaki al 15%, de nombre Lepinox

® y otra formulación bioquímica a base de ácidos grasos saponificables de soya al 15%, de nombre Biodux ®, comercializados por Abott Labs. y Duxon APS respectivamente. Como controles fueron utilizados las formulaciones blanco sin *B. thuringiensis.* Los tratamientos se evaluaron bajo 5 replicas. Después de las 24 horas de exposición a los formulados, se registró la mortalidad, y se calcularon los porcentajes de mortalidad. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA. De las larvas sobrevivientes se seleccionaron 5 larvas de cada caja petri (25 en total para cada formulado) y fueron transferidas a copas individuales conteniendo dieta artificial para *D. saccharalis.* Las 25 copas se depositaron en bolsas de papel y pasaron a incubarse a 30°C y una atmósfera de 80% de H.R. La mortalidad se registró a los 7 días y se calcularon los porcentajes de mortalidad.

Para los formulados asperjables, se calculó la cantidad del formulado seco que fue reconstituido en agua estéril, para incorporarse a la dieta artificial para *D. saccharalis* a las dosis de 50 y 500 μg del extracto de *B. thuringiensis* / ml de dieta. A continuación la dieta se distribuyó en copas (25 copas para cada dosis). Después de que la dieta se solidificó, se dejó reposar por 2 horas y se les transfirió una larva de *D. saccharalis* de 2 días de edad a cada copa, las cuales se taparon. Las 25 copas se depositaron en una bolsa de papel y se incubaron a 30°c y 80% de H. R. Un total de 75 larvas se probaron por cada dosis para cada formulación. La mortalidad se registró a los 7 días. Como controles se utilizaron copas con dieta artificial sin formulación de *B. thuringiensis.* Además fueron evaluadas a las dosis antes mencionadas, una formulación comercial a base de *B. thuringiensis* var. kurstaki al 15%, de nombre Lepinox ® y otra formulación bioquímica a base de ácidos grasos saponificables de soya al 15%, de nombre Biodux ®, comercializados por Abott Labs. y Duxon APS respectivamente. La mortalidad se registró a los 7 días y fueron analizados mediante un ANOVA.

EVALUACIÓN DE LOS FORMULADOS A NIVEL DE INVERNADERO.

Para evaluar los formulados en el invernadero se usaron plantas de maíz var. hualahuises de 15-25 días de edad. Las semillas fueron plantadas en recipientes plásticos de 2 lt de capacidad, y sometidas a regímenes de riego cada tercer día. Una vez que las plantas presentaron la 6ª hoja, se realizó el bioensayo. Para evaluar la eficacia de los formulados granulares y/o asperjables de *B. thuringiensis* desarrollados para el control de *D. saccharalis*, las formulaciones granulares fueron aplicadas en el cogollo a razón de 100 mg del formulado/ planta, mientras que las formulaciones asperjables se aplicaron por aspersión cubriendo de manera homogénea todo el follaje. Los tratamientos se infestaron de manera artificial mediante la colocación de 10 larvas de *Diatraea saccharalis* de 2 días de edad. Los tratamientos evaluados los conformaron 12 lotes de 15 plantas cada uno: 2 formulaciones granulares y 2 asperjables de *B. thuringiensis*, 2 formulaciones granulares y 2 asperjables sin *B. thuringiensis*, una formulación comercial de *B. thuringiensis* var. kurstaki al 15% de nombre Lepinox ® aplicado en forma granular y por aspersión, una formulación bioquímica a base de ácidos grasos saponificables de soya al 15% de nombre Biodux ®, comercializados por Abott Labs. y Duxon APS respectivamente y un lote control sin tratar. El daño se evaluó por la longitud de los túneles que *D. saccharalis* hizo en los tallos de maíz, para lo que se cortaron desde la base las 15 plantas de cada tratamiento.(M. McGuire et al. 1994). Además se determino el % de infestación, % de intensidad e índice de infestación, determinando en la muestra el número de tallos afectados, número de tallos totales, entrenudos totales y entrenudos afectados; además se registró la medida de los tallos y su estado fisiológico (verde o seca).

Para ello utilizamos la fórmula recomendada por el INICA.

$$\% \text{ infestación} = \frac{A \quad C}{B}$$

Donde:

A = Tallos afectados

B = Tallos totales

C = 100

$$\% \text{ de intensidad} = \frac{D \quad C}{E}$$

Donde:

D = Entrenudos afectados

E = Entrenudos totales

C = 100

Índice de Infestación (I. I.)

$$I.\ I. = \frac{\% \text{ Inf. X } \% \text{ Int.}}{100}$$

Para categorizar las plantas tratadas según su grado de resistencia utilizamos la escala de Noda y col (1983).

% Intensidad	Grado de Intensidad
0	0 Altamente resistente
0,01 – 5	1
5 – 10	2 Resistente
10.01 – 15	3
15.01 – 20	4
20.01 – 25	5 Moderadamente resistente
25.01 – 30	6
30.01 – 35	7
35.01 – 40	8 Susceptible
40.01 - más	9 Altamente susceptible

Además, se realizaron análisis de varianzas simples para comprobar que tratamiento es más efectivo, el efecto de los formulados blanco contra los formulados con ingredientes activo, el efecto del tipo de formulado (granular o asperjable), y el efecto de los formulados con ingrediente activo.

RESULTADOS

ESTABLECIMIENTO DE LA CRÍA MASIVA DE *Diatraea saccharalis* A NIVEL DE LABORATORIO.

Inicialmente realizamos una comparación basándonos en la composición de las dietas para la cría específica de *D. saccharalis* como las reportadas por Pan, Y. S. 1961; Wongsiri, T. 1962; Miskiem, G. W. 1965; Salama, H. S. 1967; Bailey, D. L. 1968; Hensley, S. D. 1968; Dinther, J. B. 1970 y Mihm, J. A. 1984, con la dieta artificial de Shorey. Soportándose en esta comparación encontramos que todas las fuentes nutrimentales básicas las poseían tanto las dietas específicas como la de Shorey, y solamente 2 de los componentes de las dietas específicas se encontraban en mayor proporción; estos componentes son la sacarosa y el agar, los cuales son la fuente de azucares necesarios para el insecto y la fuente que le da mayor consistencia a la dieta, lo que facilita que el insecto la barrene durante su fase larvaria. Estos dos componentes se incrementaron de 13 a 25 gramos y de 14 a 20 gramos respectivamente.

La cría fue implementada en nuestro laboratorio a partir del estadío pupal. Con ellas se formó la colonia lográndose obtener una 1ª generación formada de 10 machos y 16 hembras, cuyo peso en promedio fue de 0.0719 ± 0.0127 y 0.1182 ± 0.01206 gr respectivamente. Con la finalidad de comparar los pesos de las pupas obtenidos al inicio del establecimiento, se monitoreo los pesos de las mismas en la 5ª generación, una vez que se adecuaron las condiciones operacionales, nutrimentales y ambientales del establecimiento y que se tenía la colonia establecida para continuar con el desarrollo del proyecto, donde se obtuvieron 228 machos y 261 hembras, cuyos pesos promedios fueron de 0.0756 ± 0.0165 y 0.1238 ± 0.0287 gr.

Para el establecimiento de la cría, inicialmente las pupas fueron sexadas y colocadas en cubetas en base al sexo (Fig.1). Posteriormente conforme los adultos fueron eclosionando a partir del estadío pupal, se formó la colonia de adultos colocándolos en una proporción de 30 hembras y 20 machos en botes de 4 lts. de capacidad recubiertos con un soporte plástico para la ovoposición (Fig.2) y como tapa se utilizó una cubierta de gasa. Dentro de las cubetas, los adultos son alimentados con una solución azucarada al 10% proporcionada en botecillos con un algodón saturado con la solución (Fig.3), la cual se recubre con una película de polietileno con 4 perforaciones periféricas y una central de 2mm de diámetro cada una, a través del cual se extraen pequeños mechones de los cuales se alimentan.

Posteriormente los soportes son recambiados cada 24 horas, el cual es lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % y enjuagado con agua potable. Una vez lavados los soportes con los huevecillos, se dejan secar por espacio de 2 horas, para después ser desprendidos de los soportes de ovoposición. (Fig.4) Los huevecillos colectados se colocan en copas pequeñas de 4 por 1 cm (Fig.5), que a su vez son colocadas en copas de 7.5 por 5 cm conteniendo 2/3 partes de su capacidad con la dieta del insecto (Fig.6) las cuales son cubiertas con una tapa de cartón. De esta manera los huevecillos son incubados bajo una atmósfera aproximada de 80% de humedad relativa favoreciendo su desarrollo a traves de sus fases y permitiéndonos aumentar la cantidad de larvas obtenidas. (Fig. 7- 9). Los huevecillos al momento de ser colectados exhiben una coloración crema, los cuales a las 48 horas de incubación presentan un cambio en la pigmentación al cambiar a una coloración marrón; posteriormente a las 96 horas los huevecillos presentan la característica de cabeza negra, etapa en la cual se hace un recambio de tapa por una plástica, evitando el escape de larvas al momento de eclosionar al 5º día. Una vez que las larvas empiezan a eclosionar de los huevecillos, estas pasan

directamente a alimentarse a la dieta artificial de la copa (Fig.10). A continuación al cumplir dos días de eclosionadas las larvas, se prepara la dieta artificial y esta es vertida en copas de 7.5 por 4 cm a 2/3 de su capacidad, se deja enfriar por espacio de 3 horas y se forma una colonia de insectos de aproximadamente 750 a 1000 ejemplares (Fig.11).

A la mitad del ciclo larval, las larvas son transferidas a copas con dieta nueva para seguir y terminar con su desarrollo larval. Una vez terminado el ciclo larval, inicia el proceso de la pupación de larvas en el interior de la dieta (Fig.12), por lo que se procede a recolectarlas del interior de la dieta, sexarlas, separarlas y formar las colonias de pupas para continuar un nuevo ciclo.

El ciclo del insecto criado bajo las condiciones de 26-27°c, 70- 80% de H. R. y un fotoperíodo de 12/ 12h, es de 36 a 40 días, correspondientes a 5 días para el paso del estadio de huevecillo a larva, 20 a 24 días del paso de larva a pupa, de 7- 9 días del paso de pupa a adulto y 3 días como adultos (Graf. 1).

EVALUACIÓN PREELIMINAR DEL EFECTO TÓXICO DE EXTRACTOS ESPORA- CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis*

Una vez establecida la cría de *Diatraea saccharalis* por cinco generaciones se procedió a probar el efecto tóxico de 12 cepas de *Bacillus thuringiensis*, de las cuales 3 son cepas nativas y 9 de la colección H.D. Entre las cepas ensayadas estuvieron la GM 7, GM 10, GM 34, HD2, HD 9, HD 29, HD 37, HD 59, HD73, HD133, HD137 y HD551, las que fueron seleccionadas en base a su toxicidad contra lepidópteros y el contenido de proteínas Cry reportadas en la literatura. Estas cepas se probaron mediante un bioensayo preeliminar para medir su efecto tóxico contra larvas de *Diatraea saccharalis* de 2 días, a las dosis de 50 y 500 µg de *B. thuringiensis*/ ml. causando porcentajes de

mortalidad bajo la dosis de 50 μg de *B. thuringiensis*/ ml de 62, 69, 77, 37, 11, 57, 43, 41, 51, 71, 59 y 67% respectivamente (Graf. 2).

Con la finalidad de comprobar estadísticamente que cepas son las mas tóxicas se realiza un análisis de varianza donde se compara el efecto de las variables tipo de cepa contra mortalidad causada por la dosis de 50 μg/ ml, apreciándose la existencia de una alta diferencia significativa entre las dos variables ($F= 13.468$, g.l.= 11, $p< 0.05$). Mediante una comparación múltiple de medias de Tuckey, se corrobora la alta diferencia significativa existente entre las dos variables, relacionando los tratamientos en 3 grupos con niveles de significancia diferentes (Tabla 2), donde en el primer grupo con la más alta toxicidad quedan asociadas en un mismo nivel de significancia, las cepas GM34, HD133, HD 551, GM10 y GM7. Posteriormente cuando se compara las variables tipo de cepa contra mortalidad causada por la dosis de 500 μg/ ml mediante un análisis de varianza, se observa la existencia de una alta diferencia significativa entre las dos variables ($F= 30.454$, g.l.= 11, $p< 0.05$), lo cual se reafirma después mediante una comparación múltiple de medias de Tuckey, agrupándonos los tratamientos en 3 niveles de significancia diferentes (Tabla 2). Finalmente se realizó un tercer análisis de varianza donde se comparan las variables dosis contra mortalidad, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre las dos variables ($F= 46.394$, g.l.= 2, $p< 0.05$) Posteriormente mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey, esta nos separó los 3 tratamientos en 3 grupos significativamente diferentes (Tabla 3).

Mediante los resultados del preeliminar del efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*, se escogieron aquellas cepas que mostraron tener un efecto tóxico por arriba del 60% de mortalidad bajo la dosis de 50 μg/ ml; siendo estas las cepas GM34, HD 133, HD 551, GM10 y GM 7 (Grafica 2).

DETERMINACIÓN DE LA DOSIS LETAL MEDIA (LD_{50}) DE *Bacillus thuringiensis* CONTRA *D. saccharalis.*

Una vez seleccionadas las cepas de *Bacillus thuringiensis* más tóxicas contra *Diatraea saccharalis*, se procedió a llevar a cabo la determinación de la dosis letal media (LD_{50}) para las cepas GM7, GM10, GM34, HD133, HD551 y para las combinaciones equimolares de las cepas GM10/ GM34 y HD133/ HD551. Para ello se realizó un bioensayo de incorporación a la dieta, donde el extracto espora- cristal de las cepas más tóxicas se incorporaron a las dosis de 10, 25, 35, 55, 65, 75, 85 y 100 μg/ ml.

Las dosis letales medias obtenidas fueron de **95,99 μg/ ml** para la GM7, **104.99 μg/ ml** para la GM10, **33.21μg/ ml** para la GM34, **85.63 μg/ ml** para la HD133, **67.22 μg/ ml** para la HD551, **65.91 μg/ ml** para la combinación GM10/GM34 y **67.68 μg/ ml** para la combinación HD133/HD551 (Grafica 3). Basándose en estos resultados la cepa GM34 de *B. thuringiensis* fue seleccionada ya que resultó ser la más tóxica, dado que se requiere de una dosis baja para matar el 50% de la población.

DETERMINACIÓN DEL TIEMPO LETAL MEDIO (TL_{50})

Una vez seleccionada la cepa GM 34 de *Bacillus thuringiensis* como la más tóxica contra *Diatraea saccharalis*, se procedió a determinar su tiempo letal medio contra este insecto plaga. Para ello se llevó a cabo 2 determinaciones por triplicado de este parámetro, siendo estos tiempos letales medios de 3.9, 3.6, 4.7, 4.7, 5.4 y 5.0 días, resultando como TL_{50} promedio 4.55 ± 0.667d para esta cepa contra *D. saccharalis* (Tabla 4).

BIOENSAYO DE PREFERENCIA ALIMENTICIA

Posteriormente teniendo la cepa de *Bacillus thuringiensis* más tóxica y sus parámetros de toxicidad como lo son la dosis letal media y tiempo letal medio, continuamos con la búsqueda de una adecuado soporte para el entomopatógeno para desarrollar un formulado, el cual tenga un efecto fagoestimulante.

Se elaboraron 20 soportes diferentes compuestos de una matriz polimérica sola y/o combinada con un aditivo fagoestimulante (Tabla No. 1). Mediante bioensayos de preferencia alimenticia se procedió a seleccionar un soporte óptimo para formular a *Bacillus thuringiensis* GM34, el cual tuviese un efecto fagoestimulante para *D. saccharalis*, probando además la preferencia que tiene por ellos contra trozos de caña de azúcar. Cuando se analiza el grado de preferencia presentado por las larvas contra los 20 soportes de formulación y los trozos de caña de azúcar en relación al número de larvas atraídas mediante un ANOVA, ello nos arroja la existencia de una alta diferencia significativa ($F= 40.365$, g.l.= 20, $P< 0.05$). Consecutivamente mediante la prueba de Tuckey, nos confirma la alta diferencia significativa existente en relación con la preferencia alimenticia, agrupándonos los 21 tratamientos (20 soportes y 1 caña de azúcar) en 11 grupos de significancia distintos (Tabla 5). De estos los tratamientos mayormente aceptados son los compuestos de gelatina panoja (Gl-pan) en primer lugar, y la caña de azúcar y gelatina melaza (Gl- mel) en segundo, presentando como Medias ± D. Std. 4.59 ± 1.99, 3.85 ± 1.90 y 3.14 ± 1.85 larvas atraídas respectivamente.(Grafica 4)

Por otra parte se realiza un segundo análisis con la finalidad de comprobar el efecto que tienen los soportes con fagoestimulantes y los que carecen de ellos, evaluando como parámetro de comparación con trozos de caña de azúcar. Para ello se analiza el efecto de preferencia hacia los soportes con o sin fagoestimulantes y la caña de azúcar contra el número de larvas atraídas, indicándonos la existencia de una alta diferencia

significativa (F= 129.86, g.l.=2, P<0.05); a continuación mediante la prueba de Tuckey nos confirma la existencia de la diferencia significativa en relación con la preferencia, agrupándonos los tratamientos en 2 grupos con niveles de significancia diferentes (Tabla 6). Los tratamientos primeramente aceptados son la caña de azúcar y los soportes con fagoestimulantes y en segundo lugar se agrupan los soportes sin fagoestimulantes, presentando como medias de atracción 3.85 ± 1.90, 2.23 ± 1.76 y 1.10 ± 1.23 larvas respectivamente (Grafica 5).

Una vez encontrado el efecto que provoca la presencia de fagoestimulantes en los soportes de formulación, se procede a comprobar el efecto que induce cada uno de los fagoestimulantes probados. Para ello un tercer análisis realizado fue un ANOVA en donde se analizaron las variables tipo de fagoestimulante contra el número de larvas atraídas, el cual nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables (F= 98.394, g.l.= 5, P<0.05). Posteriormente mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, nos confirma la existencia de una alta diferencia significativa, agrupándonos los 6 tratamientos en 5 niveles de significativamente diferentes(Tabla 7). Los tratamientos mayormente aceptados son la caña de azúcar en primer lugar, la panoja en segundo y la melaza en tercero, presentando como medias 3.85 ± 1.90, 3.15 ± 1.93 y 2.26 ± 1.70 larvas atraídas respectivamente (Grafica 6).

Comprobado el efecto que provocan los soportes con aditivos y sin ellos, así como cada uno de los aditivos probados, a continuación con el propósito de comprobar el efecto que provoca cada una de las matrices encapsulantes en relación a la preferencia alimenticia de *D.* saccharalis se realizó un análisis de varianza de las variables tipo de matriz encapsulante sin aditivo contra el número de larvas atraídas, demostrándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables (F= 63.835, g.l.= 4, P<0.05). Después mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey nos

reafirma la existencia de la alta diferencia significativa existente en la relación de las variables tipo de matriz encapsulante y número de larvas atraídas, agrupándonos los 5 tratamientos en 3 niveles de significancia diferentes (Tabla 8). Los tratamientos mayormente aceptadas son la caña de azúcar en primer lugar y la gelatina en segundo, presentando como medias 3.85 ± 1.90 y 2.73 ± 2.07 larvas atraídas respectivamente (Grafica 7).

Finalmente se realizaron algunos análisis de varianza donde se analizaron las variables tipo soporte a base de cada matriz encapsulante contra el número de larvas atraídas, con la finalidad de ver el efecto de los soportes compuestos a partir de una misma matriz encapsulante en relación a la preferencia. En primer lugar se analizaron las variables tipo de soporte a base de gelatina contra el número de larvas atraídas, el cual nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables ($F= 48.554$, g.l.= 5, $P<0.05$). Posteriormente mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, nos confirma la existencia de la alta diferencia significativa, agrupándonos los 6 tratamientos en 4 niveles de significativamente diferentes (Tabla 9). Los soportes a base de gelatina mayormente aceptados son gelatina panoja (Gl-pan) en primer lugar, y la caña de azúcar y gelatina melaza (Gl-mel) en segundo lugar, los cuales comparten el mismo nivel de significancia, presentando como medias 4.59 ± 1.99, 3.85 ± 1.90 y 3.14 ± 1.85 larvas atraídas respectivamente (Grafica 8). En segundo lugar se analizaron las variables tipo de soporte a base de pectina contra el número de larvas atraídas, el cual nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables ($F= 62.294$, g.l.= 5, $P<0.05$). Consecutivamente mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey nos confirma la existencia de una alta diferencia significativa, agrupándonos los 6 tratamientos en 4 niveles de significativamente diferentes (Tabla 10). Los tratamientos mayormente aceptados son la caña de azúcar en primer lugar y la pectina panoja (Po-pan) en segundo, presentando como medias 3.85 ± 1.90 y 2.62 ± 1.73 larvas atraídas

respectivamente (Grafica 9). En tercer lugar se analizaron las variables tipo soporte a partir de gelatina: pectina en proporción 1:1 contra el número de larvas atraídas, el cual nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables (F= 39.506, g.l.= 5, P<0.05); enseguida mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, se confirma la existencia de una alta diferencia significativa, agrupándonos los 6 tratamientos en 5 niveles de significativamente diferentes(Tabla 11). Los tratamientos mayormente aceptados son la caña de azúcar en primer lugar, y gelatina: pectina 1:1 panoja (Gl:Po 1:1-pan) y gelatina: pectina 1:1 melaza (Gl:Po 1:1-mel) en segundo lugar, los cuales comparten un mismo nivel de significancia, presentando como medias 3.85 ± 1.90, 2.59 ± 1.62 y 2.18 ± 1.62 larvas atraídas respectivamente (Grafica 10). Y como cuarto lugar se analizaron las variables tipo soporte a base de gelatina: pectina en proporción 1:2 contra el número de larvas atraídas, el cual nos indica la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables (F= 41.176, g.l.= 5, P<0.05), lo cual se confirma mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, agrupándonos los 6 tratamientos en 4 niveles de significativamente diferentes(Tabla 12). Los tratamientos mayormente aceptados son la caña de azúcar en primera instancia y gelatina: pectina 1:2 panoja (Gl:Po 1:2-pan) en segundo, los cuales presentaron como medias 3.85 ± 1.90 y 2.81 ± 1.62 larvas atraídas respectivamente (Grafica 11).

FORMULACIÓN DE *Bacillus thuringiensis.*

Una vez teniendo seleccionada la cepa más tóxica de *Bacillus thuringiensis* y los soportes de formulación más aceptados mediante preferencia alimenticia, se procedió a

elaborar las formulaciones, el cual consistió en hacer la mezcla de la matriz encapsulante, del aditivo fagoestimulante al 4% y del extracto espora- cristal de *B. thuringiensis* al 7%.

En la elaboración de las formulaciones granulares se utilizaron los soportes compuestos de gelatina- panoja y gelatina- melaza. Las formulaciones desarrolladas fueron cuatro, estando constituidas de gelatina panoja y gelatina- melaza como formulaciones blanco, y de gelatina- panoja *B. t.* 7% y Gelatina melaza *B. t.*7% como formulaciones con ingrediente activo para el biocontrol.

La manera en que se produjeron las formulaciones consistió en llevar a cabo el tamizado de los componentes sólidos de la formulación para asegurar la homogeneidad de los componentes dentro del formulado. Posteriormente todos los constituyentes son integrados con la mínima cantidad de agua destilada necesaria para formar una pasta.

Los componentes que conformaron las formulaciones se presentan en la siguiente tabla:

COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES GRANULARES.				
FORMULACIÓN	GELATINA (g)	FAGOESTIMULANTE (g)	*B. thuringiensis* (g)	H_2O_d (ml)
Gl-pan-Bco.	200 g	8 g	0 g	100ml
Gl-pan- *B. t.*	200 g	8 g	14 g	100ml
Gl-mel-Bco.	200 g	8 g	0 g	100ml
Gl-mel-*B. t.*	200 g	8 g	14 g	100ml

Después de la integración de los componentes, la pasta se deja reposar por espacio de 1- 2 horas. Transcurrido el tiempo de reposo, la pasta se hace pasar a través de un tamiz malla No.20 mediante la aplicación de presión, haciendo la función de una extrusión. El material obtenido en forma de hebras se recupera en un tamiz de malla No.6, en el cual se le aplica una acción rotatoria para cortar las hebras y obtener gránulos pequeños de tamaño homogéneo. El formulado producido se

recupera y es secado dentro de una campana de flujo laminar por 18 horas, para finalmente ser almacenado en frascos plásticos rotulados.

Para la elaboración de las formulaciones asperjables de *Bacillus thuringiensis* se utilizaron los soportes compuestos de gelatina- panoja y gelatina- melaza, con los cuales se produjeron cuatro formulaciones. Las formulaciones gelatina- panoja y gelatina-melaza son utilizadas como blanco, mientras que las formulaciones gelatina- panoja- *B. t.* 7% y gelatina melaza *B.t.*7% contienen el ingrediente activo a evaluar.

Para la producción de los formulados asperjables, se procedió a preparar 750 ml de formulación donde la matriz encapsulante estaba al 2%, el aditivo fagoestimulante al 4% y el ingrediente activo al 7%.

Los componentes que conformaron las formulaciones se presentan en la siguiente tabla:

COMPONENTES DE LAS FORMULACIONES ASPERJABLES.				
FORMULACIÓN	GELATINA (g)	FAGOESTIMULANTE (g)	*B. thuringiensis* (g)	H_2O_d (ml)
Gl-pan-Bco.	15 g	30 g	0 g	750 ml
Gl-pan- *B. t.*	15 g	30 g	52.5 g	750 ml
Gl-mel-Bco.	15 g	30 g	0 g	750 ml
Gl-mel-*B. t.*	15 g	30 g	52.5 g	750 ml

Una vez preparadas las soluciones se procede a secarlas mediante aspersión. Para ello el secador por aspersión es encendido, activando a la vez 6 resistencias de calentamiento y dejando transcurrir 10 minutos antes de iniciar el proceso del secado. Se coloca en la base del ciclone, una jarra o frasco para la recuperación del polvo seco. Posteriormente se activa la entrada de aire a la turbina aspersora a una presión de 3,600 a 4,200 kPa/ cm^2 y se inyecta agua a la turbina aspersora a un flujo de 6 ml/ min. La

temperatura de la cámara de secado se regula a 135°C y la temperatura del aire de salida de 80 a 90°C. Una vez reguladas las condiciones óptimas para el secado de las formulaciones, se inicia la inyección de la formulación asperjable, la cual se encuentra bajo agitación ligera durante el transcurso del proceso.

EVALUACIÓN DE LOS FORMULADOS A NIVEL DE LABORATORIO.

Una vez elaboradas las formulaciones granulares: 2 a partir de *B. thuringiensis* y 2 Blanco, estas fueron evaluadas utilizando 2 formulaciones comerciales como parámetro de comparación: una formulación biológica a partir de *B. thuringiensis* var. kurstaki (Lepinox ®) y una formulación bioquímica a base de ácidos grasos saponificables de semillas de soya (Biodux ®).

Cuando se realiza un análisis de varianza a las variables tipo de formulado contra el número de larvas muertas a las 24 horas, este nos indica la existencia de una alta diferencia significativa existente al relacionar ambas variables ($F= 33.302$, g.l.= 5, $P<0.05$). A continuación al realizar la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey, esta nos asocia los 6 tratamientos en 3 grupos diferentes que comparten el mismo nivel de significancia (Tabla 13). Los tratamientos que produjeron la más alta mortalidad son la formulación Gelatina- panoja- *B. t.* en primer lugar, y gelatina- melaza- *B. t.* y lepinox ® en segundo, produciendo una mortalidad de 8.00 ± 1.41, 6.40 ± 1.34 y 5.20 ± 2.77 larvas muertas respectivamente(Grafica 12). Los porcentajes de mortalidad generados por los tratamientos a las 24 horas son relativamente bajos, pero estos se incrementan de manera considerable para los tratamientos en los que el ingrediente activo es *Bacillus thuringiensis*, no sucediendo así para los tratamientos blanco y el Biodux ®. La mortalidad

generada a las 24 horas por los tratamientos Gelatina- panoja- *B.t.*, Gelatina- melaza- *B.t.* y lepinox ® es de 40, 32 y 26% de mortalidad, incrementándose a los 7 días a 100%, 92% y 88% de mortalidad, mientras que la mortalidad ocasionada por el tratamiento Biodux ® se incrementa solamente del 2% a las 24 horas a 8% a los 7 días (Tabla 13).

Por otra parte se comprobó el efecto que posen las formulaciones elaboradas de *B. thuringiensis* contra cada una de las formulaciones comerciales. Mediante el análisis de varianza realizado a las variables tipo de formulado (Blancos, elaborados a base de *B. t.* y lepinox ®) contra el número de larvas muertas a las 24 hrs., este nos demuestra la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables ($F= 56.562$, g.l.=2, $P<0-05$), lo cual se reafirma mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tuckey, asociándonos los 3 tratamientos en 2 grupos significativamente diferentes (Tabla 14). Tanto las formulaciones elaboradas y el lepinox ® comparten el mismo nivel de significancia produciendo una mortalidad de 7.20 ± 1.55 y 5.20 ± 2.77 larvas respectivamente (Grafica 13). Otro análisis de varianza se realiza a las variables tipo de formulado (Blancos, elaborados a base de *B. t.* y Biodux ®) contra el número de larvas muertas a las 24 hrs., señalándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables($F= 144.814$, g.l.=2, $P<0.05$), lo cual se confirma mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, asociándonos los 3 tratamientos dentro de 2 grupos con niveles de significancia diferentes(Tabla 15). Las formulaciones elaboradas a base de *B. thuringiensis* resultaron ser las más efectivas generando una mortalidad de 7.20 ± 1.55 larvas. Dentro del segundo grupo de significancia, quedan asociadas la formulación a base de ácidos grasos saponificables de soya (Biodux ®) y las formulaciones blanco, produciendo una mortalidad de 0.40 ± 0.55 y 0.00 ± 0.00 larvas respectivamente. (Grafica 14).

Con la finalidad de comprobar el efecto tóxico generado solamente por las formulaciones que contenían *B.* thuringiensis contra *Diatraea* saccharalis, finalmente se

analizaron mediante un ANOVA las variables tipo de formulado a base de *B. thuringiensis* contra el número de larvas muertas a las 24 horas, indicándonos que no existe diferencia significativa entre las variables ($F= 2.574$, g.l.= 2, $P< 0.05$), lo cual se reafirma mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey, asociándonos los tres tratamientos dentro de un mismo nivel de significancia(Tabla 16). La mortalidad generada por las formulaciones Gelatina- panoja- *B. t.*, gelatina- melaza- *B. t.* y Lepinox ® fueron de 8.00 ± 1.41, 6.40 ± 1.34 y 5.20 ± 2.77 larvas respectivamente (Grafica 15).

Por otra parte además fueron elaboradas formulaciones asperjables a base de los mismos soportes de formulación: 2 formulaciones blanco, dos formulaciones a base de *Bacillus thuringiensis* GM 34. Estas formulaciones fueron evaluadas como referencia con una formulación comercial a base de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki (Lepinox ®) y una formulación bioquímica a base de ácidos grasos saponificables de soya (Biodux ®).

Las formulaciones asperjables fueron evaluadas mediante bioensayos de incorporación a la dieta, donde los formulados se incorporaron a las dosis de 50 y 500 μg de *B. t.*/ ml de dieta. Un total de 11 tratamientos fueron evaluados: 2 formulaciones blanco, 2 formulaciones de *B. thuringiensis* a 50 μg/ ml y 500μg/ ml, Lepinox ® a 50 μg/ ml y 500μg/ ml, Biodux ® a 50 μg/ ml y 500μg/ ml y un control.

Con la finalidad de evaluar la toxicidad de la totalidad de los tratamientos asperjables mediante una ANOVA simple, fueron analizados las variables tipo de tratamiento y el número de larvas muertas, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables analizadas ($F= 54.451$; g.l.= 10; $P<0.05$). Posteriormente mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey se confirma la diferencia, asociándonos los 11 tratamientos en 3 grupos que compartes el mismo nivel de significancia(Tabla 17). La mortalidad más alta la produjeron todos los tratamientos donde el ingrediente activo es *Bacillus thuringiensis* independientemente de la dosis, generando una mortalidad que

oscila de 24.22 ± 0.58 a 25.00 ± 0.00 larvas, equivalentes del 97 al 100% de larvas muertas.(Gráfica 16).

Con el objeto de deducir el efecto de los formulados desarrollados a base de *Bacillus thuringiensis* y los formulados comerciales, los tratamientos fueron reagrupados debido a que la dosis no provoca ningún efecto en la evaluación, donde los 2 tratamientos de lepinox ®, de biodux ® y los 2 formulados blanco son asociados en un tratamiento respectivamente y los 4 formulados elaborados que contienen *B. thuringiensis* en otro (2 formulados desarrollados de *B. thuringiensis* a dos dosis). Una vez reorganizados los tratamientos se realiza un análisis de varianza para ver el efecto de los formulados blanco, los formulados a base de *B. thuringiensis* desarrollados y los formulados comerciales contra la mortalidad generada, señalándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables ($F= 70.776$; g.l.= 4; $P<0.05$), hecho que se reafirma mediante la prueba de Tuckey, la cual nos asocia los 5 tratamientos en 3 grupos con diferente nivel de significancia (Tabla 18). La mortalidad más alta es generada por los formulados a base de *B. thuringiensis* y lepinox ®, compartiendo el mismo nivel de significancia, los cuales provocaron un 99% de mortalidad.(Grafica 17).

Finalmente otros análisis fueron realizados, en donde se compara el efecto que tienen los formulados blanco y los formulados con *B. thuringiensis* a las dosis de 50 y 500μg/ ml, y que a su vez presentan un soporte encapsulante en común, con la finalidad de analizar el efecto de las dosis para un mismo tipo de formulado. Primero se analizaron mediante un ANOVA, las variables tipo de formulación a partir de gelatina- panoja contra el número de larvas muertas, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables ($F= 164.171$; g.l.= 3; $P<0.05$), la cual se confirma mediante la prueba de Tuckey, ya que nos asocia los 4 tratamientos en 2 grupos significativamente diferentes(Tabla 19). La mortalidad más alta la causan las formulaciones Gelatina panoja *B.*

t.(50µg/ ml) y Gelatina panoja *B. t.*(500µg/ ml), compartiendo el mismo nivel de significancia y provocando respectivamente 99 y 100% de mortalidad(Gráfica 18). Posteriormente se analizaron mediante un ANOVA, las variables tipo de formulación a partir de gelatina- melaza contra el número de larvas muertas, revelándonos la existencia de una alta diferencia significativa (F= 758.333; g.l.= 3; P<0.05). A continuación mediante la prueba de Tuckey se reafirma la diferencia significativa, asociando los tratamientos en 2 niveles de significancia(Tabla 20). La mayor mortalidad la causaron las formulaciones Gelatina melaza B. t. (50µg/ ml) y gelatina melaza *B. t.* (500µg/ ml), los cuales comparten el mismo nivel de significancia, provocando respectivamente 97 y 100% de mortalidad.(Gráfica 19).

EVALUACIÓN DE LOS FORMULADOS A NIVEL DE INVERNADERO.

A continuación con la finalidad de corroborar la eficiencia de los formulados a nivel de laboratorio, los formulados además fueron evaluados en el invernadero utilizando plantas de maíz de la variedad hualahuises. Fueron evaluados 12 tratamientos: 4 formulados granulares (2 blanco y 2 con *B. thuringiensis*), 4 formulados asperjables (2 blanco y 2 con *B. thuringiensis)*, Biodux ®, Lepinox ® asperjable, Lepinox ® granular y un control. Diversos parámetros se monitorearon para cada tratamiento como los números de tallos totales, de tallos afectados, de entrenudos totales y de entrenudos afectados, para a continuación calcular con ellos el porcentaje de infestación, el porcentaje de intensidad e índice de infestación. Con lo que respecta al número de tallos y entrenudos afectados, los tratamientos gelatina- melaza- *B.t.*- asperjable, gelatina- panoja- *B.t.*- asperjable y Lepinox ®- asperjable son los menos dañados, así como también estos mismos

tratamientos fueron los que presentaron el mayor número de entrenudos totales, por lo que se reflejó en un mayor desarrollo de la planta.(Tabla 21). En lo que se refiere a los porcentajes de infestación, los tratamientos gelatina- melaza- *B.t.*- asperjable y gelatina-panoja- *B.t.*- asperjable presentaron el más alto grado de protección, provocando solo un 0 y 7 % de tallos infestados respectivamente(Tabla 22). Por otro lado los tratamientos gelatina- melaza- *B.t.*- asperjable, gelatina- panoja- *B.t.*- asperjable y Lepinox ®- asperjable mostraron los más bajos índices de infestación, siendo estos de 0, 0, y 2 respectivamente.(Tabla 22)

El parámetro grado de intensidad nos refleja el grado de protección o resistencia que sufren las plantas por acción de algún factor, en este caso la formulación, en donde los tratamientos gelatina- melaza- *B.t.*- asperjable y gelatina- panoja- *B. t.*- asperjable no presentaron daño alguno (0); además el tratamiento Lepinox ® asperjable exhibió bajo nivel de daño, presentando un grado de intensidad de 2.(Tabla 22).

Además de los parámetros evaluados, se realizaron algunos análisis mediante un ANOVA simple. En primer lugar se analizaron las variables tipo de tratamiento contra la variable No. de entrenudos afectados para determinar que tratamientos fueron los menos afectados, y ello nos arrojó la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables ($F= 18.04$, g.l.= 11, $P< 0.05$), hecho que se reafirma mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey, asociándonos los 12 tratamientos en 3 grupos que comparten el mismo nivel de significancia (Tabla 23). Los tratamientos menos afectados debido a la protección producida por los formulados son el de gelatina- melaza- *B. t.*- asperjable, gelatina- panoja- *B. t.*- asperjable, Lepinox ®- asperjable y Gelatina-panoja- *B. t.*- granular presentando 0.00 ± 0.00, 0.06 ± 0.26, 0.87 ± 1.68 y 1.73 ± 2.34 entrenudos afectados respectivamente, correspondiéndoles el 0, 1, 13 y 27% de entrenudos afectados (Grafica No. 20).

Un segundo análisis se efectúa para determinar el mejor tratamiento asperjable. Para ello, se analizan mediante ANOVA simple las variables tipo de tratamiento asperjable contra la variable número de entrenudos afectados, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre las variables (F= 25.275, g.l.= 6, P< 0.05), lo cual se confirma mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey, agrupándonos los 7 tratamientos en 3 grupos que comparten el mismo nivel de significancia. (Tabla 24). Los tratamientos asperjables más efectivos en la protección de las plantas son Gelatina-melaza- *B. t.*- asperjable, Gelatina- panoja- *B. t.*- asperjable y Lepinox ®- asperjable, los cuales comparten el más alto nivel de significancia, presentando 0.00 ± 0.00, 0.06 ± 0.26 y 0.87 ± 1.68 entrenudos afectados respectivamente correspondiéndoles el 0, 1 y 13% (Gráfica21).

Un tercer análisis se realiza para determinar el mejor tratamiento granular, en donde se analizan mediante ANOVA simple las variables tipo de tratamiento granular contra el número de entrenudos afectados, estableciendo la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables (F= 5.798, g.l.= 6, P< 0.05), resultado que se confirma mediante la prueba de comparación múltiple de medias de Tuckey, asociándonos los 7 tratamientos en 2 grupos que comparten el mismo nivel de significancia (Tabla 25). Los tratamientos granulares más efectivos en la protección de las plantas son Gelatina-panoja *B. t.*- granular, Gelatina- melaza- *B. t.*- granular y Biodux ® presentando respectivamente 1.73 ± 2.34, 3.80 ± 2.81 y 3.87 ± 4.26 entrenudos afectados, correspondiéndoles un 27, 59 y 60% de entrenudos afectados (Grafica 22).

Un cuarto análisis se efectuó con el objetivo de determinar cual de los tratamientos es el más efectivo según su tipo de aplicación (granular o asperjable), para ello fueron reagrupados los tratamientos en base al tipo de formulado, ya sea granular o asperjable con/ sin ingrediente activo, donde por ejemplo los 2 tratamientos blanco sin *B. thuringiensis* son reagrupados en un tratamiento, ejemplo de ello son los tratamientos

gelatina- panoja- bco- asperjable y gelatina- melaza- bco- asperjable, que son reagrupados como gelatina- bco- asperjable. Se analizaron mediante ANOVA simple las variables tipo de tratamiento contra el número de entrenudos afectados, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables (F= 25.762, g.l.= 7, P< 0.05), hecho que se reafirma mediante la prueba de Tuckey, donde nos agrupa los 8 tratamientos en 4 niveles significativamente diferentes (Tabla No. 26). Los tratamientos menos afectados debido a la protección producida por los formulados son Gelatina- *B. t.*- asperjables y Lepinox ®- asperjable, generando 0.03 ± 0.18 y 0.87 ± 1.68 entrenudos afectados respectivamente, correspondiéndoles el 1 y 14% de entrenudos afectados. (Grafica 23).

Un ultimo análisis se realizo, con el fin de determinar el o los tratamientos con ingrediente activo más efectivos, en donde se analizan las variables tipo de tratamiento contra el número de entrenudos afectados, indicándonos la existencia de una alta diferencia significativa entre ambas variables (F= 14.591, g.l.= 7, P< 0.05), hecho que se reafirma mediante la prueba de Tuckey, agrupando los 8 tratamientos en 3 niveles significativamente diferentes (Tabla 27). Los tratamientos menos afectados debido a la protección producida por los formulados son gelatina- mel- *B. t.*- asperjables, gelatina-pan- *B. t.*- asperjable y Lepinox ®- asperjable, encontrándose en el mismo nivel de significancia los cuales generaron 0.00 ± 0.00, 0.06 ± 0.27 y 0.87 ± 1.68 entrenudos afectados respectivamente, correspondientes al 0, 1 y 14% de entrenudos afectados. (Grafica 24).

Tabla No. 2.- Ensayo preeliminar del efecto tóxico de cepas de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

CEPA.[n]	$\mu \pm \sigma$ del Número de larvas muertas bajo la dosis de 50 µg de *B. t.*/ ml.	$\mu \pm \sigma$ del Número de larvas muertas bajo la dosis de 500 µg de *B. t.*/ ml.	% DE MORTALIDAD[a]
GM 7	10.67 ± 2.08ab	20.33 ± 1.15abc	62
GM 10	13.33 ± 2.08ab	21.00 ± 1.00ab	67
GM 34	17.33 ± 2.08a	21.33 ± 3.06ab	77
HD 2	2.67 ± 1.53c	15.67 ± 1.15c	37
HD 9	2.33 ± 1.53c	3.33 ± 1.53c	11
HD 29	6.33 ± 2.52bc	22.00 ± 0.00ab	57
HD37	2.67 ± 0.58c	18.67 ± 0.58abc	43
HD59	2.67 ± 1.53c	18.00 ± 0.00bc	41
HD73	7.00 ± 0.00bc	18.33 ± 2.89bc	51
HD 133	12.33 ± 2.08ab	23.33 ± 2.08a	71
HD137	8.00 ± 2.00bc	21.33 ± 2.08ab	59
HD551	12.33 ± 5.77ab	21.33 ± 0.58ab	67
control	0.00 ± 0.00c	0.00 ± 0.00c	0

N= 1800 larvas, n= 75, a= mortalidad ocasionada por la dosis de *B.* thuringiensis de 50µg/ml; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en rojo corresponden al análisis de las variables No. de larvas muertas bajo la dosis de bajo la dosis de 50 µg de *B. t.*/ ml y tipo de cepa; letras en verde corresponden al análisis de las variables No. de larvas muertas bajo la dosis de bajo la dosis de 500 µg de *B. t.*/ ml y tipo de cepa.

Tabla No. 3. Ensayo preeliminar del efecto de la dosis de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

DOSIS (µg *B. t.* /ml)	µ ± σ del Numero de larvas muertas	% DE MORTALIDAD
0 ^{n_2}	0.00 ± 0.00c	0
50 ^{n_1}	8.14 ± 5.29b	33
500 ^{n_1}	18.72 ± 5.31a	75

N= 1825 larvas, n^1= 900, n^2= 25; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en rojo corresponden al análisis de las variables No. de larvas muertas y dosis de *B. thuringiensis*.

Tabla 4.- DETERMINACIÓN DEL TL_{50} DE *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*

TL_{50} DEL EXTRACTO ESPORA- CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* GM34	
REPETICIÓN ^{n}	TL_{50} EN DÍAS
1ª	3.9
2ª	3.6
3ª	4.7
4ª	4.7
5ª	5.4
6ª	5.0
µ ± σ	4.55 ± 0.667

N= 180, n= 30; TL_{50}= tiempo letal medio.

Tabla 5.- SELECCIÓN DE SOPORTES DE FORMULACIÓN PARA *Bacillus thuringiensis* CON CARÁCTER FAGOESTIMULANTE PARA *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE[n]	$\mu \pm \sigma$ del No. larvas atraídas	R. P.	SOPORTE[n]	$\mu \pm \sigma$ del No. larvas atraídas	R. P.
Gl Pan	4.59± 1.99a	1°	Gl Coa	1.72± 1.43ghij	7°
Caña	3.85± 1.90ab	1°	Gl:Po 1:2 Zan	1.53± 1.27ghijk	7°
Gl Mel	3.14± 1.85bc	2°	Po Coa	1.51± 1.47ghijk	7°
Gl Zan	2.85± 1.75cd	3°	Po Mel	1.58± 1.25ghijk	7°
Gl:Po 1:2 Pan	2.81± 1.62cd	3°	Gl:Po 1:1 Coa	1.51± 1.23ghijk	7°
Gl:Po 1:1 Pan	2.59± 1.62cdef	3°	Gl	1.37± 1.60hijk	8°
Po Pan	2.62± 1.73cde	3°	Gl:Po 1:1	1.14± 1.22ijk	9°
Gl:Po 1:2 Mel	2.13±1.67defgh	4°	Po Zan	1.11± 1.03ijk	9°
Gl:Po 1:1 Mel	2.18± 1.62defg	4°	Gl:Po 1:2	1.05± 1.03jk	10°
Gl:Po 1:2 Coa	1.91± 1.55efgh	5°	Po	0.83± 0.90k	11°
Gl:Po 1:1 Zan	1.84± 1.45fghi	6°			

N= 2100 comparaciones, n= 100 comparaciones, valores seguidos por letras iguales no son diferentes significativamente; letras en rojo corresponden al análisis de las variables tipo de soporte contra número de larvas atraídas; R. P.= rango de preferencia; Po= pectina, Gl= geltina, Gl:Po= gelatina- pectina, pan= panoja, mel= melaza, coa=coax, zan= zanahoria.

Tabla 6.- Efecto de la presencia o ausencia de fagoestimulantes en los soportes de formulación para *B. thuringiensis* contra *D. saccharalis.*

SOPORTE	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar ^{n1}	3.85 ± 1.90 a	1°
Soporte c/ fagoestimulantes ^{n2}	2.23 ± 1.76 a	1°
Soporte s/ fagoestimulantes ^{n3}	1.10 ± 1.23 b	2°

N= 2100 comparaciones, n^1= 100, n^2= 1600, n^3= 400; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en verde corresponden al análisis de las variables soporte con/ sin fagoestimulante contra número de larvas atraídas.

Tabla 7.- Efecto de los fagoestimulantes en los soportes de formulación para *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar ^{n1}	3.85 ± 1.90a	1°
Panoja ^{n2}	3.15 ± 1.93b	2°
Melaza ^{n2}	2.26 ± 1.70c	3°
Zanahoria ^{n2}	1.83 ± 154d	4°
Coax ^{n2}	1.66 ± 1.46d	4°
Sin fagoestimulante ^{n2}	1.10 ± 1.23e	5°

N= 600 comparaciones, n^1= 100 comparaciones, n^2= 400 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de fagoestimulante contra número de larvas atraídas.

Tabla 8.- Efecto de las matrices encapsulantes en los soportes de formulación para *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE [n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar	3.85 ± 1.90a	1°
Gelatina	2.73 ± 2.07b	2°
Gelatina: Pectina 1:2	1.89 ± 1.58c	3°
Gelatina: Pectina 1:1	1.85 ± 1.52c	3°
Pectina	1.53 ± 1.44c	3°

N= 500 comparaciones, n= 100 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de matriz encapsulante contra número de larvas atraídas.

Tabla 9.- Efecto de los soportes a base de gelatina para la formulación de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE [n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Gelatina panoja	4.59 ± 1.99a	1°
Caña de azúcar	3.85 ± 1.90b	2°
Gelatina melaza	3.14 ± 1.85bc	2°
Gelatina zanahoria	2.85 ± 1.75c	3°
Gelatina coax	1.72 ± 1.43d	4°
Gelatina	1.37 ± 1.60d	4°

N= 600 comparaciones, n= 100 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de soporte a base de gelatina contra número de larvas atraídas.

Tabla 10.- Efecto de los soportes a base de pectina para la formulación de *Bacillus thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

SOPORTE [n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar	3.85 ± 1.90a	1º
Pectina panoja	2.62 ± 1.73b	2º
Pectina melaza	1.58 ± 1.25c	3º
Pectina coax	1.51 ± 1.47c	3º
Pectina zanahoria	1.11 ± 1.03cd	3º
Pectina	0.83 ± 0.90d	4º

N= 600 comparaciones, n= 100 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de soporte a base de pectina contra número de larvas atraídas

Tabla 11.- Efecto de los soportes a base de Gelatina: pectina 1:1 para la formulación de *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

SOPORTE [n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar	3.85 ± 1.90a	1º
Gl:Po 1:1 panoja	2.59 ± 1.62b	2º
Gl:Po 1:1 melaza	2.18 ± 1.62bc	2º
Gl:Po 1:1 zanahoria	1.84 ± 1.45cd	3º
Gl:Po 1:1 coax	1.51 ± 1.23de	4º
Gl:Po 1:1	1.14 ± 1.22e	5º

N= 600 comparaciones, n= 100 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de soporte a base de Gelatina: pectina 1:1 contra número de larvas atraídas; Gl:Po = Gelatina: Pectina.

Tabla 12.- Efecto de los soportes a base de Gelatina: pectina 1:2 para la formulación de *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE [n]	μ ± σ del No. de larvas atraídas	RANGO DE PREFERENCIA
Caña de azúcar	3.85 ± 1.90a	1º
Gl:Po 1:2 panoja	2.81 ± 1.62b	2º
Gl:Po 1:2 melaza	2.13 ± 1.67c	3º
Gl:Po 1:2 coax	1.91 ± 1.65c	3º
Gl:Po 1:2 zanahoria	1.53 ± 1.27cd	3º
Gl:Po 1:2	1.05 ± 1.03d	4º

N= 600 comparaciones, n= 100 comparaciones; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de soporte a base de Gelatina: pectina 1:2 contra número de larvas atraídas; Gl:Po = Gelatina: pectina.

Tabla 13.- Evaluación a nivel laboratorio de la actividad tóxica de las formulaciones granulares de *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

SOPORTE	24 horas			7 días	
	μ ± σ del No. de larvas muertas	PORCIENTO DE MORTALIDAD [n1]	R. de T.	PORCIENTO DE MORTALIDAD [n2]	R. de T.
Gelatina-panoja-*B. t.*	8.00 ± 1.41a	40 %	1º	100%	1º
Gelatina-melaza-*B. t.*	6.40 ± 1.34ab	32 %	1º	92%	2º
Lepinox ®	5.20 ± 2.77b	26 %	2º	88%	3º
Biodux ®	0.40 ± 0.55c	2 %	3º	8%	4º
Gelatina-panoja-Bco.	0.00 ± 0.00c	0%	3º	0%	5º
Gelatina-melaza-Bco.	0.00 ± 0.00c	0%	3º	0%	5º

N= 600, n^1= 100, n^2= 25, valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente, letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra número de larvas muertas; R. de T.= rango de toxicidad.

Tabla 14.- Evaluación de la actividad tóxica a las 24 horas de las formulaciones granulares con/ sin *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas muertas	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Formulaciones con *B. t.* ^{n_1}	7.20 ± 1.55a	36 %	1º
Lepinox ®^{n_2}	5.20 ± 2.77a	26 %	1º
Formulaciones Bco. ^{n_1}	0.00 ± 0.00b	0%	2º

N= 500 larvas, n^1= 200, n^2= 100; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con/ sin *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 15.- Evaluación de la actividad tóxica a las 24 horas de las formulaciones granulares con/ sin *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis.*

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas muertas	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Formulaciones con *B. t.* ^{n_1}	7.20 ± 1.55a	36 %	1º
Biodux ®^{n_2}	0.40 ± 0.55b	2 %	2º
Formulaciones Bco. ^{n_1}	0.00 ± 0.00b	0%	2º

N= 500, n^1= 200, n^2=100; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente, letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con/ sin *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 16.- Evaluación de la actividad tóxica a las 24 horas de las formulaciones granulares con *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$ del No. de larvas muertas	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Gelatina-panoja-*B. t.*	8.00 ± 1.41a	40 %	1°
Gelatina-melaza-*B. t.*	6.40 ± 1.34a	32 %	1°
Lepinox ®	5.20 ± 2.77a	26%	1°

N= 300, n= 100; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 17.- Evaluación de la actividad tóxica de las formulaciones asperjables de *B. thuringiensis* contra *Diatraea saccharalis*.

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$DEL No. LARVAS MUERTAS	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Gl- pan- bco	3.33 ± 3.51 c	13	3°
Gl- mel- bco	1.33 ± 1.53 c	5	3°
Gl- pan- B.t. 50	24.67 ± 0.58 ab	99	1° 2°
Gl- mel- B.t. 50	24.33 ± 0.58 ab	97	1° 2°
Gl- pan- B.t 500	25.00 ± 0.00 a	100	1°
Gl- mel- B.t. 500	25.00 ± 0.00 a	100	1°
Biodux ® 50	7.00 ± 3.61 c	28	3°
Biodux ® 500	17.33 ± 6.35 b	69	2°
Lepinox ® 50	25.00 ± 0.00 a	100	1°
Lepinox ® 500	24.22 ± 1.15 ab	97	1° 2°
Control	0.33 ± 0.58 c	1	3°

N= 775, n= 75; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra número de larvas muertas.

Tabla 18.- Evaluación de la actividad tóxica de las formulaciones asperjables de *B. thuringiensis* desarrolladas y comerciales contra *Diatraea saccharalis* a nivel laboratorio.

FORMULADO [N]	$\mu \pm \sigma$DEL No. LARVAS MUERTAS	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Control[n1]	0.33 ± 0.58c	1	3°
Formulados Blanco[n2]	2.33 ± 2.66c	9	3°
Biodux ®[n3]	12.17 ± 7.31b	49	2°
Lepinox ®[n3]	24.67 ± 0.82a	99	1°
Formulados *B. t.* [n4]	24.73 ± 0.47a	99	1°

N= 775, n_1= 25, n_2= 150, n_3= 75, n_4= 300; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra número de larvas muertas

Tabla 19.- Evaluación de la actividad tóxica de las formulaciones asperjables a partir de Gelatina panoja como soporte contra *Diatraea saccharalis* a nivel laboratorio.

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$DEL No. LARVAS MUERTAS	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Control	0.33 ± 0.58b	1	2°
Gel- pan- blanco	3.33 ± 3.51b	13	2°
Gel- pan- *B.t.* 50	24.67 ± 0.58a	99	1°
Gel- pan- *B.t.* 500	25.00 ± 0.00a	100	1°

N= 825, n= 75; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra número de larvas muertas

Tabla 20.- Evaluación de la actividad tóxica de las formulaciones asperjables a partir de Gelatina melaza como soporte contra *Diatraea saccharalis* a nivel laboratorio.

FORMULADO	$\mu \pm \sigma$DEL No. LARVAS MUERTAS	PORCIENTO DE MORTALIDAD	RANGO DE TOXICIDAD
Control	0.33 ± 0.58 b	1	2°
Gel- mel- blanco	1.33 ± 1.53 b	13	2°
Gel- mel- *B.t.* 50	24.33 ± 0.58 a	97	1°
Gel- mel- *B.t.* 500	25.00 ± 0.00 a	100	1°

N= 825, n= 75; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación contra número de larvas muertas

Tabla 21.- Medición de parámetros estimados de la evaluación de la actividad tóxica a nivel de invernadero de las formulaciones desarrolladas y comerciales contra *Diatraea saccharalis*.

FORMULADO [N]	No. de TALLOS TOTALES [n]	No. de TALLOS AFECTADOS	No. de ENTRENUDOS TOTALES	No. de ENTRENUDOS AFECTADOS
Control.	15	15	116	95
Gl- pan- Bco.- A	15	15	120	97
Gl- mel- Bco.- A	15	15	115	84
Gl- pan- Bco.- G	15	15	90	74
Gl- mel- Bco.- G	15	15	116	97
Lepinox ®- G	15	14	128	71
Gl- pan- *B. t.*- A	15	1	169	1
Gl- mel- *B. t.*- A	15	0	160	0
Gl- pan- B. t.- G	15	9	146	26
Gl- mel- B. t.- G	15	12	121	57
Biodux ®	15	9	135	58
Lepinox ®- A	15	4	162	13

N= 180; n= 15.

Tabla 22.- Parámetros calculados de la evaluación de la actividad tóxica a nivel de invernadero de las formulaciones desarrolladas y comerciales contra *Diatraea saccharalis.*

FORMULADO [N, n]	PORCIENTO DE INFESTACIÓN	PORCIENTO DE INTENSIDAD	ÍNDICE DE INFESTACIÓN	GRADO DE INTENSIDAD
Control.	100	82	82	9
Gl- pan- Bco.- A	100	81	81	9
Gl- mel- Bco.- A	100	73	73	9
Gl- pan- Bco.- G	100	82	82	9
Gl- mel- Bco.- G	100	84	84	9
Lepinox ®- G	93	55	51	9
Gl- pan- *B. t.*- A	7	1	0	0
Gl- mel- *B. t.*- A	0	0	0	0
Gl- pan- B. t.- G	60	18	11	4
Gl- mel- B. t.- G	80	47	38	9
Biodux ®	60	43	26	9
Lepinox ®- A	27	8	2	2

N= 180; n= 15.

Tabla 23.- Evaluación a nivel invernadero de la actividad tóxica de las formulaciones contra *Diatraea saccharalis.*

FORMULADO[N, n.]	$\mu \pm \sigma$ del No. de entrenudos afectados	PORCIENTO DE DAÑO	RANGO DE PROTECCIÓN
Gel-mel-*B.t.*-Asp.	0.00 ± 0.00a	0%	1°
Gel-pan-*B.t.*-Asp.	0.07 ± 0.26a	1%	1°
Lepinox ®-Asp.	0.87 ± 1.68a	13%	1°
Gel-pan-*B.t.*-Gran.	1.73 ± 2.34ab	27%	1°, 2°
Gel-mel-*B.t.*-Gran.	3.80 ± 2.81bc	59%	2°, 3°
Biodux ®	3.87 ± 4.26bc	60%	2°, 3°
Lepinox ®-Gran.	4.73 ± 2.34c	73%	3°
Gel-pan-Bco.-Gran.	4.93 ± 1.62c	76%	3°
Gel-mel-Bco.-Asp.	5.60 ± 2.20c	87%	3°
Control	6.33 ± 2.29c	98%	3°
Gl-pan-Bco.-Asp.	6.47 ± 2.23c	100%	3°
Gl-mel-Bco.-Gran.	6.47 ± 1.85c	100%	3°

N= 180, n= 15; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 24.- Evaluación a nivel invernadero de la actividad tóxica de las formulaciones asperjables contra *Diatraea saccharalis.*

FORMULADO[N, n.]	$\mu \pm \sigma$ del No. de entrenudos afectados	PORCIENTO DE DAÑO	RANGO DE PROTECCIÓN
Gel-mel-*B.t.*-Asp.	0.00 ± 0.00a	0%	1°
Gel-pan-*B.t.*-Asp.	0.07 ± 0.26a	1%	1°
Lepinox ®-Asp.	0.87 ± 1.68a	13%	1°
Biodux ®.	3.87 ± 4.26b	60%	2°
Gel-mel-Bco.- Asp.	5.60 ± 2.20bc	87%	2°, 3°
Control	6.33 ± 2.29bc	98%	2°, 3°
Gel-pan-Bco.-Asp.	6.47 ± 2.23c	100%	3°

N= 105, n=15; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 25.- Evaluación a nivel invernadero de la actividad tóxica de las formulaciones granulares contra *Diatraea saccharalis*.

FORMULADO[N, n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de entrenudos afectados	PORCIENTO DE DAÑO	RANGO DE PROTECCIÓN
Gel-pan-*B.t.*-Gran.	1.73 ± 2.34a	27%	1°
Gel-mel-*B.t.*-Gran.	3.80 ± 2.81ab	59%	1°, 2°
Biodux ®.	3.87 ± 4.26ab	60%	1°, 2°
Lepinox ®- Gran.	4.73 ± 2.34b	73%	2°
Gel-pan-Bco.-Gran.	4.93 ± 1.62b	76%	2°
Control	6.33 ± 2.29b	98%	2°
Gel-mel-Bco.-Gran.	6.47 ± 1.85b	100%	2°

N= 105, n= 15; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 26.- Eficiencia de las formulaciones granulares o asperjables contra *Diatraea saccharalis* a nivel invernadero.

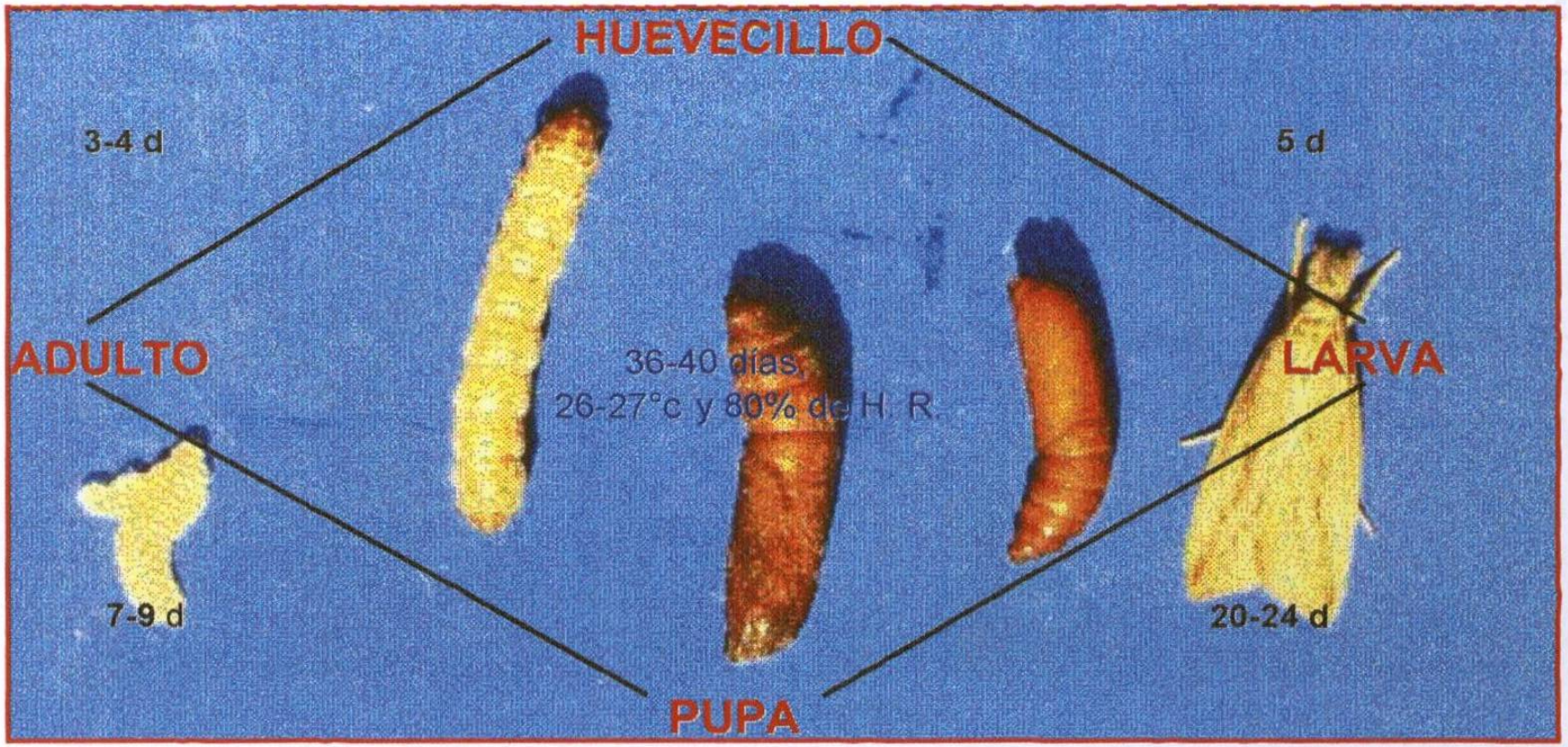
FORMULADO[N]	$\mu \pm \sigma$ del No. de entrenudos afectados	PORCIENTO DE DAÑO	RANGO DE PROTECCIÓN
Gel-*B.t.*- Asp.[n°]	0.03 ± 0.18a	1%	1°
Lepinox ®- Asp.[n°]	0.87 ± 1.68a	14%	1°
Gel- *B.t.*- Gran.[n°]	2.77 ± 2.75b	44%	2°
Biodux ® [n°]	3.87 ± 4.26bc	61%	2°, 3°
Lepinox ®- Gran.[n°]	4.73 ± 2.34cd	75%	3°, 4°
Gel-Bco.- Gran.[n°]	5.70 ± 1.88cd	90%	3°, 4°
Gel-Bco.- Asp.[n°]	6.03 ± 2.22d	95%	4°
Control [n°]	6.33 ± 2.29d	100%	4°

N= 180, n[a]= 15, n[b]= 30; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.

Tabla 27.- Determinación de la actividad tóxica de las formulaciones con ingrediente activo contra *Diatraea saccharalis* a nivel de invernadero.

FORMULADO[N, n]	$\mu \pm \sigma$ del No. de entrenudos afectados	PORCIENTO DE DAÑO	RANGO DE PROTECCIÓN
Gel-mel-*B.t.*- Asp.	0.00 ± 0.00a	0%	1°
Gel- pan-*B.t.*- Asp.	0.07 ± 0.26a	2%	1°
Lepinox ®- Asp.	0.87 ± 1.68a	14%	1°
Gel-pan.-*B.t.*- Gran.	1.73 ± 2.34ab	27%	1°, 2°
Gel-mel-*B.t.*- Gran.	3.80 ± 2.81bc	60%	2°, 3°
Biodux ®.	3.87 ± 4.26bc	61%	2°, 3°
Lepinox ®- Gran.	4.73 ± 2.34c	75%	3°
Control	6.33 ± 2.29c	100%	3°

N= 120, n= 15; valores seguidos por letras iguales, no son diferentes significativamente; letras en azul corresponden al análisis de las variables tipo de formulación granular con *B. thuringiensis* contra número de larvas muertas.



Graf.1.- Ciclo Vital de *Diatraea saccharalis* obtenido en el laboratorio