

RESULTADOS

Establecimiento de la cría masiva de *D. saccharalis*.

El establecimiento de la cría de *D. saccharalis* dio como resultado una cría masiva, suficiente para la realización de bioensayos a nivel de laboratorio y de campo. Las modificaciones realizadas a la dieta de *T. ni* aumentaron grandemente la producción de larvas de *D. saccharalis*. Con la dieta, las condiciones de humedad, temperatura y fotoperíodo que se emplearon, se logró acortar el tiempo de generación de 43 días (Legaspi *et al.*, 1984), a 30-35 días, lo que permitió tener una generación por mes, facilitando la realización de los bioensayos y este factor representó una gran ventaja comparado con las poblaciones naturales que se presentan 4 ó 5 veces al año (Legaspi *et al.*, 1984), (Fig .9).

Bioensayos de toxicidad contra *D. saccharalis*.

En los bioensayos de toxicidad, se probaron 12 cepas de *B. thuringiensis*, con la finalidad de seleccionar las cepas tóxicas a *D. saccharalis*. En estos bioensayos se probaron 2 dosis del complejo espora-cristal, una baja de 50 µg/ml y una alta de 500 µg/ml. Las mortalidades obtenidas en este experimento para ambas dosis se muestran en la Tabla 10 y en la Fig. 10. La selección de las cepas tóxicas contra *D. saccharalis*, se determinó al obtener una mortalidad mayor al 50% con la dosis de 50 µg/ml. A partir de este criterio de selección se consideraron como tóxicas las cepas: HD-133, HD-551, GM7, GM10 y GM34. Los resultados obtenidos de los bioensayos de mortalidad se sometieron a un análisis de varianza y comparación de medias por la prueba de Tukey, $P \leq 0.05$. Estos análisis mostraron que no hay diferencia significativa en la mortalidad causada por estas 5 cepas ($F = 1.852$, $gl = 4$, $P \leq 0.05$). En la Fig.11 se muestra el daño causado a las larvas de *D. saccharalis*, las larvas control se observan sanas y con un crecimiento adecuado, mientras que por otra parte, las larvas expuestas a *B. thuringiensis* murieron o bien se intoxicaron de tal manera que dejaron de alimentarse y no se desarrollaron.

Detección de genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* y *cry1C* mediante análisis de PCR e inmunodetección de proteínas Cry.

Se determinó la presencia de los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* y *cry1C* en todas las cepas tóxicas. Estos resultados se esquematizan en la Tabla 11 y en las Figs. 12, 13 y 14. La cepa seleccionada, GM34, posee los genes *cry1Aa*, *cry1Ab* y *cry1Ac*. El análisis de inmunodetección mostró que las 5 cepas tóxicas sintetizan alguna de las proteínas Cry1A y únicamente la cepa HD-551 sintetiza la proteína Cry1B (carril 6, Fig. 15B), de acuerdo al análisis de PCR la cepa GM7 posee el gen *cry1B*, pero mediante la inmunodetección no se observó la proteína correspondiente a este gen (Fig. 15).

Determinación de la concentración letal media y tiempo letal medio.

Los resultados obtenidos de los bioensayos en los cuales se utilizaron 8 concentraciones diferentes fueron sometidos al análisis estadístico Probit y se muestran en la Tabla 12. La cepa que presentó la menor CL₅₀ (33.21 µg/ml) fue la GM34. Adicionalmente se hicieron mezclas de los complejos espora-cristal de las cepas HD y GM con la finalidad de observar si disminuía la CL₅₀, ésta disminuyó con respecto a las CL₅₀ individuales, pero no mejoró con respecto a la CL₅₀ de la GM34. En la misma Tabla se observa que la cepa GM34 es 3 veces más tóxica que la GM10, casi 3 veces más que la GM7, 2.6 veces más tóxica que la HD-133 y 2 veces más tóxica que la HD-551. El tiempo letal medio para la cepa GM34 fue de 3 días.

Bioensayos de preferencia alimenticia.

Los resultados obtenidos entre los polímeros con fagoestimulantes y sin fagoestimulantes sometidos a un análisis de varianza, mostraron una alta diferencia significativa ($F= 24.6526$, $gl= 1$, $P \leq 0.01$). Se observó también una alta diferencia significativa entre los fagoestimulantes utilizados en cada soporte. La caña de azúcar en polvo fue el fagoestimulante más aceptado por las larvas, seguido por el azúcar y finalmente por el Coax®, como se muestra en la Tabla 13.

La comparación de medias mostró que las formulaciones B3 y C3 son ampliamente aceptadas por las larvas y las formulaciones a base de Capsul® (almidón de maíz modificado) exclusivamente fueron las menos aceptadas por las larvas, Tabla 14 .

Determinación de la actividad tóxica de los formulados contra *D. saccharalis* a nivel de laboratorio.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionó el soporte B3 y la cepa GM34 para elaborar el formulado en forma granular y asperjable. Posteriormente se procedió a la realización de los bioensayos correspondientes. En la Fig. 16 se muestra la mortalidad causada por las formulados granulares en bioensayos de laboratorio a las 24 horas y a los 4 días. A los 4 días se observó que la mortalidad se incrementó en todas las dosis, causando hasta 81% de mortalidad con la dosis de 10%. La Fig. 17 muestra la mortalidad causada por los formulados asperjables en bioensayos de laboratorio, en este caso, cada una de las dosis fue ajustada a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La mortalidad causada fue similar para las tres dosis a las 24 horas, presentando este mismo comportamiento a los 7 días, lo cual era el efecto esperado debido al ajuste de las dosis, sin embargo la mortalidad causada los 7 días fue mayor en comparación con la causada a las 24 h.

Microscopía electrónica de barrido.

Las fotografías al microscopio electrónico de barrido en la Fig. 18, muestran al formulado asperjable en forma de gránulos ligeramente colapsados, de superficie lisa y se observa un buen encapsulamiento, su tamaño varía de 15 a 45 μ . Los formulados granulares en la Fig. 18 se observan como fragmentos de forma irregular cubiertos a su vez de fragmentos más pequeños. Su tamaño es muy variable, sin embargo los fragmentos grandes fluctúan alrededor de las 550 μ .

Las esporas y los cristales mostrados en la Fig. 19 de cada una de las cepas presentaron características diferentes. Las 5 cepas forman cristales bipiramidales, pero difieren en su tamaño, los cristales de la cepa GM34 miden $3.5 \mu \pm 0.27$, los de la HD-551 miden $4.5 \mu \pm 0.17$, los de la GM10 miden $5.70 \mu \pm 0.21$, los de la GM7 miden $7.8 \mu \pm 0.39$ y los de la HD-133 miden $5.80 \mu \pm 0.42$. En la Tabla 15 se observa que hay diferencia significativa entre los tamaños de los cristales producidos ($F = 27.691$, $gl = 4$, $P \leq 0.001$).

Pruebas de campo.

Las especies de plagas de barrenadores que estuvieron presentes en la localidad de La Escalera, municipio de Ameca, en el estado de Jalisco fueron: *Diatraea considerata* y

Eoreuma loftini. Las larvas encontradas fueron consideradas como un complejo para efectos de la evaluación.

Las plantas estaban en la etapa fenológica conocida como "pelillo", esto es, los rebrotos que salen después de la siembra o de la cosecha (en el caso de soca y resoca). El cultivo de caña donde se realizó el estudio de campo tenía de 35 a 55 cm de altura en sus cepas con 14 tallos por cepa en promedio.

Evaluación de la fitotoxicidad.

La evaluación de la fitotoxicidad de las dosis de *B. thuringiensis* aplicadas al cultivo fue realizada a las 24 h y a los 5 días después de la aplicación de los tratamientos. El valor registrado para cada tratamiento, en la escala del 1 al 9 fue de 1 en todos los casos. Esto es, ninguna de las dosis de *B. thuringiensis* aplicadas tuvieron efecto fitotóxico al cultivo.

Evaluación de daños.

Los síntomas de la presencia de barrenadores de tallos son el secamiento de hojas ubicadas en la porción superior de la planta debido a la destrucción del meristemo primario, tornándose las hojas centrales de color pajizo (Bounet, 1983), en México este tipo de daño es conocido como "corazón muerto". Éste fue el criterio utilizado para la selección del sitio experimental y en los muestreos del efecto de los tratamientos evaluados en el daño en los tallos. Los datos obtenidos en los muestreos de daño fueron sometidos a un análisis de varianza y se observa en la Tabla 16.

La Tabla 17 presenta los promedios de las cepas con daño de barrenador por tratamiento. Se aprecia que las mayores cantidades de cepa con incidencia de daño ocurrieron en la etapa inicial del experimento, esto es, el día de la aplicación y 5 días después. En los muestreos a los 38 y 64 días después de la aplicación, la incidencia de tallos dañados fue muy baja, esto ocurrió así debido a que la incidencia poblacional de barrenadores no se incrementó.

Al aplicar la técnica de contrastes a los tratamientos el día de la aplicación, el análisis de varianza indicó que hubo diferencias solamente en el contraste de la dosis baja del asperjable (3%) contra las dosis media y alta del asperjable (7 y 10%) Tabla 18. De acuerdo con este resultado se podría ver que la dosis más adecuada para aplicar en campo sería la dosis media de 7% de asperjable, ya que fue igual a la de 10% asperjable.

Los tratamientos granulares tuvieron los niveles de daño más altos, superando incluso al testigo sin aplicación. Al realizar contrastes entre los tratamientos granulares y los asperjables hubo diferencias altamente significativas (contraste 3). También fue significativo el contraste entre los tratamientos con base en los granulares, 3, 7 y 10% contra el testigo comercial (contraste 8) esto se observa 5 días después de la aplicación, Tabla 19.

En el análisis mediante contrastes realizado con los resultados del muestreo a los 38 y a los 64 días después de la aplicación, no hubo diferencias significativas entre ningún contraste. Esto indica que todos los tratamientos fueron estadísticamente iguales. El período de efectividad de las dosis de *B. thuringiensis* ya había concluido, pero las poblaciones de barrenadores en el área de estudio no se habían incrementado, por lo que no se apreció diferencia entre tratamientos, Tablas 20 y 21.

El daño causado en la caña puede observarse en la Fig. 20 y el procesamiento de la caña se aprecia en la Fig. 21.

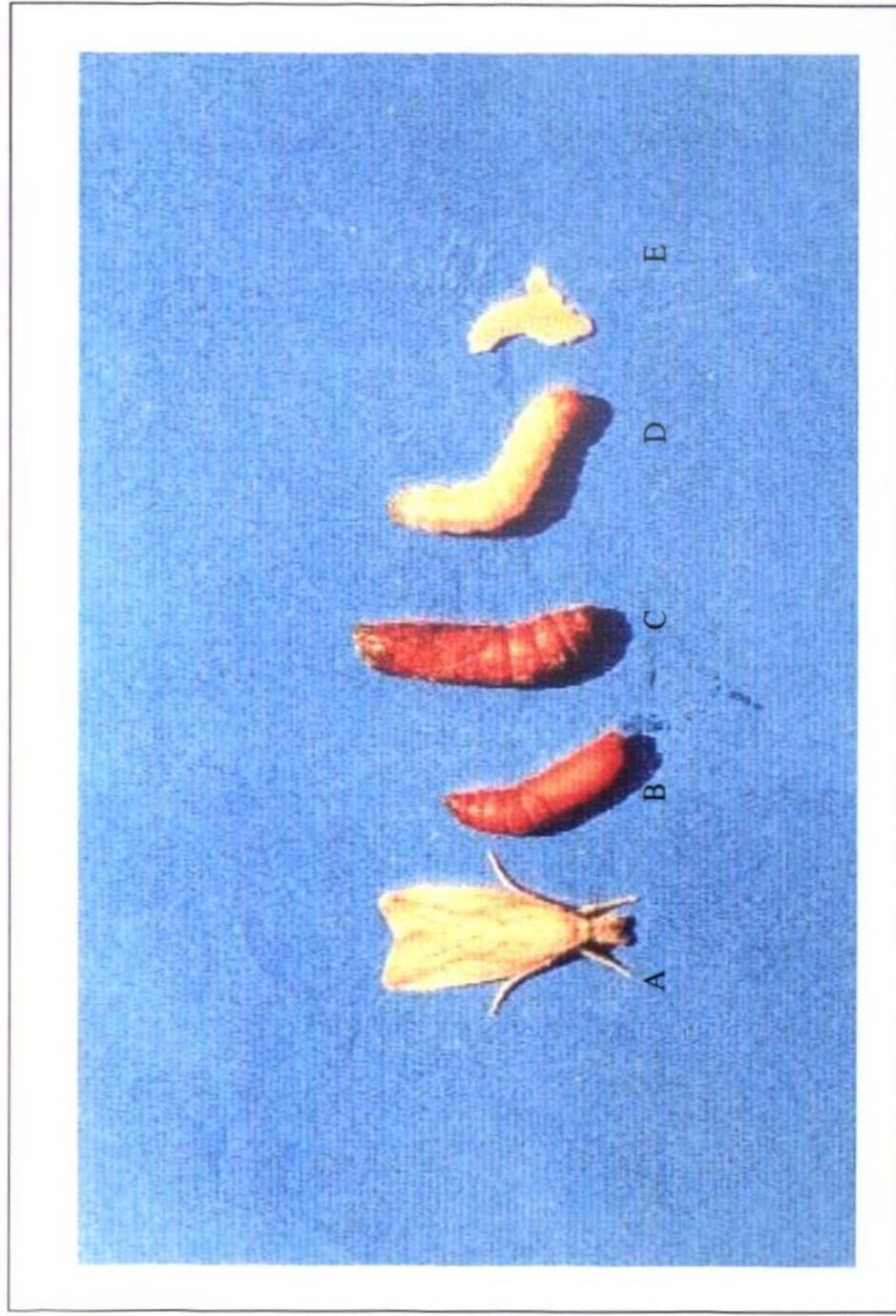


Fig. 9. Ciclo biológico de *Diatraea saccharalis*. A) adulto, B) pupa macho, C) pupa hembra, D) larva, E) huevecillos

Tabla 10. Bioensayo de mortalidad de las cepas de *B. thuringiensis* contra *D. saccharalis* utilizando dosis alta y baja del complejo espora-cristal.

Cepas	50 μ g/ml	500 μ g/ml
HD-2	12.31	69.12
HD-9	10.61	14.08
HD-29	31.15	100.00
HD-37	12.31	96.55
HD-59	13.11	83.08
HD-73	41.18	88.71
HD-133	62.71	98.59
HD-137	40.68	100.00
HD-551	64.91	100.00
GM7	50.79	95.31
GM10	66.67	96.92
GM34	78.79	96.97

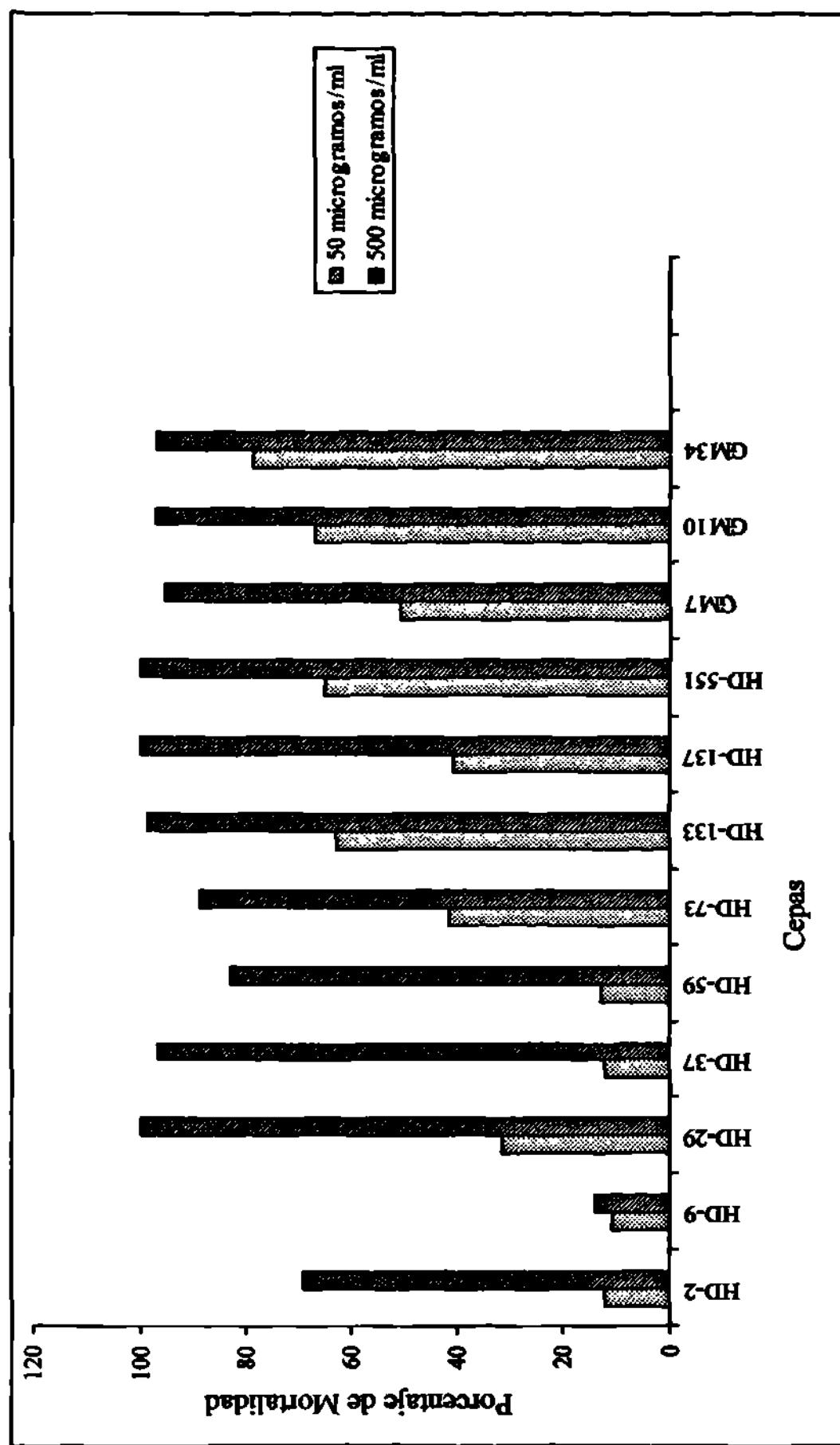
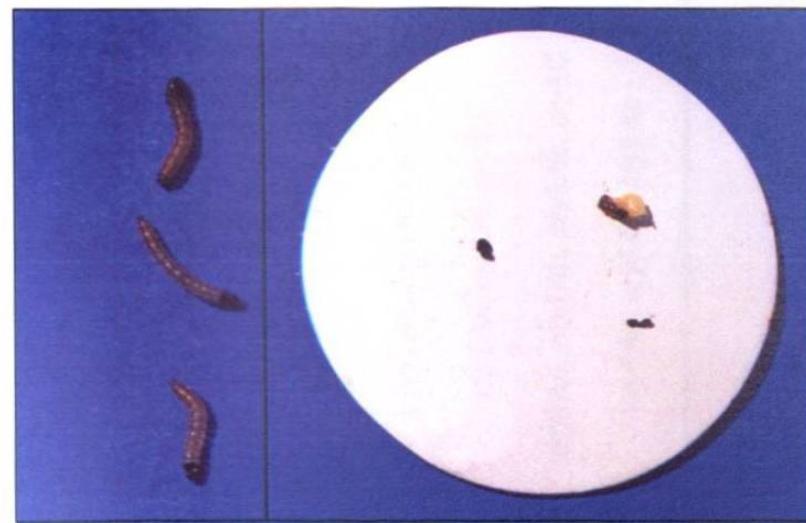


Fig 10. Bioensayo de mortalidad de las 12 cepas de *B. thuringiensis* contra larvas de dos días de edad de *D. saccharalis*.



A

B



C

D

Fig 11. Larvas obtenidas después de la realización de los bioensayos. En cada una de ellas se muestran las larvas control, así como las larvas muertas y las sobrevivientes, pero intoxicadas. A) y C) larvas control de 9 días de edad, B) larvas muertas, D) larvas intoxicadas de 9 días de edad.

Tabla 11. Presencia de genes *cry1A*, *B* y *C* en las cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*.

Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	Genes <i>cry</i>
HD-133	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1C</i>
HD-551	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> <i>cry1B</i>
GM7	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> <i>cry1B</i>
GM10	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1C</i>
GM34	<i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i>

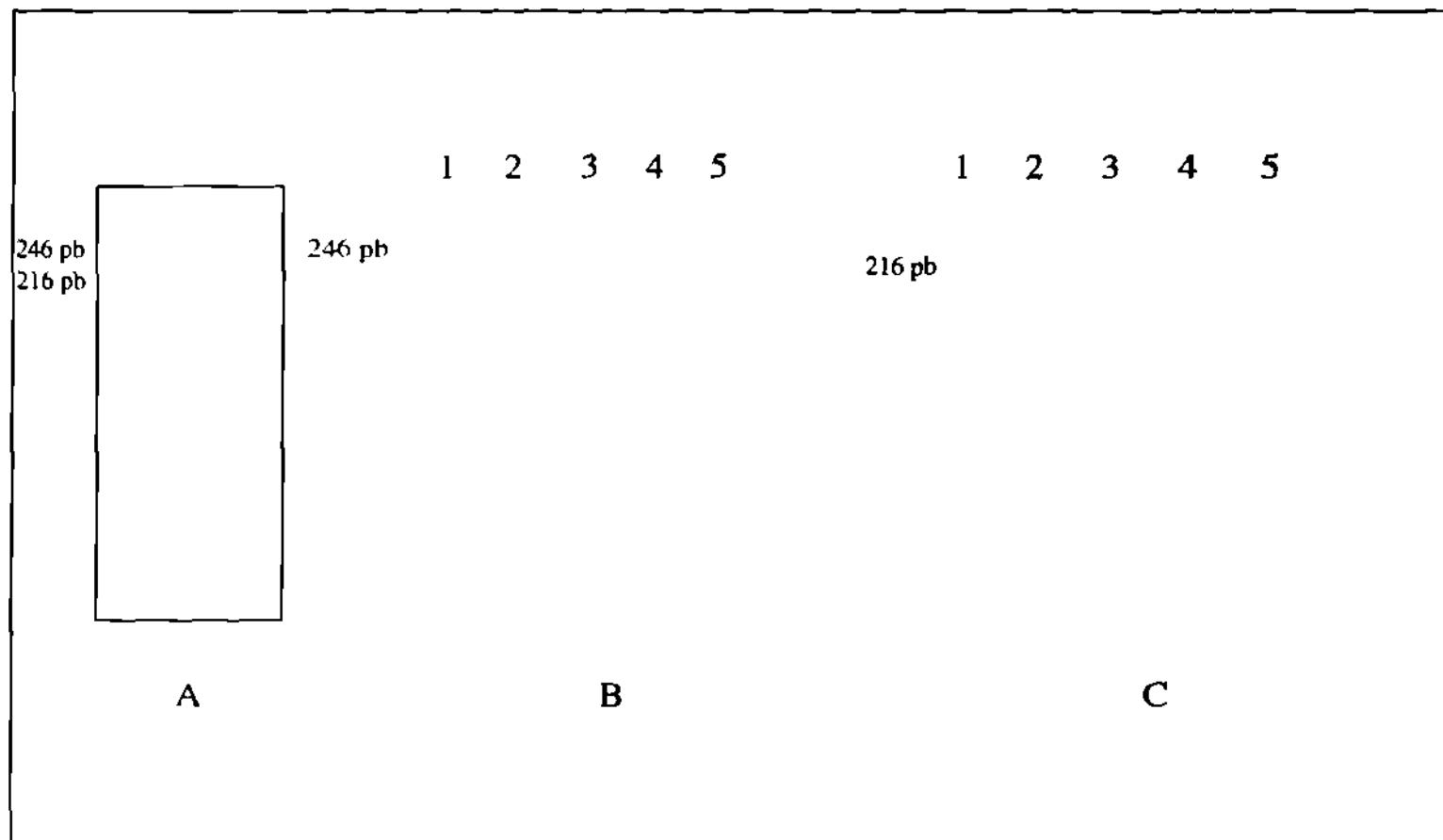


Fig. 12. Detección de los genes *cry1Aa* y *cry1Ab* en diferentes cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*.

Panel A) cepa HD-1, carril 1, *cry1Aa*; 2, *cry1Ab*.

Panel B) detección de *cry1Aa*. Carril 1, HD-133; 2, HD-551; 3, GM7; 4, GM10; 5, GM34.

Panel C) detección de *cry1Ab*. Carril 1, HD-133; 2, HD-551; 3, GM7; 4, GM10; 5, GM34.

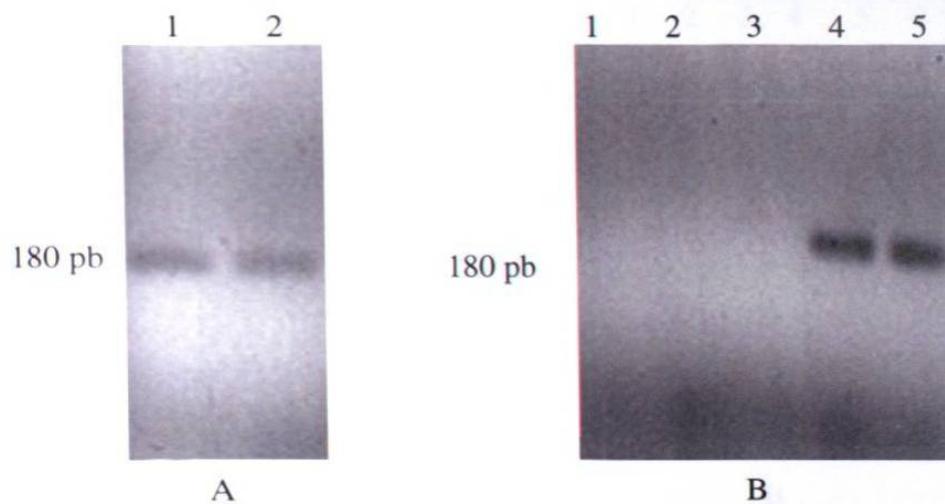


Fig 13. Detección del gen *cry1Ac* en diferentes cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*.

Panel A) carril 1, HD-1 para *cry1Ac*; 2, HD-73, para *cry1Ac*.

Panel B) carril 1, HD-133; 2, HD-551; 3, GM7; 4, GM10; 5, GM34.

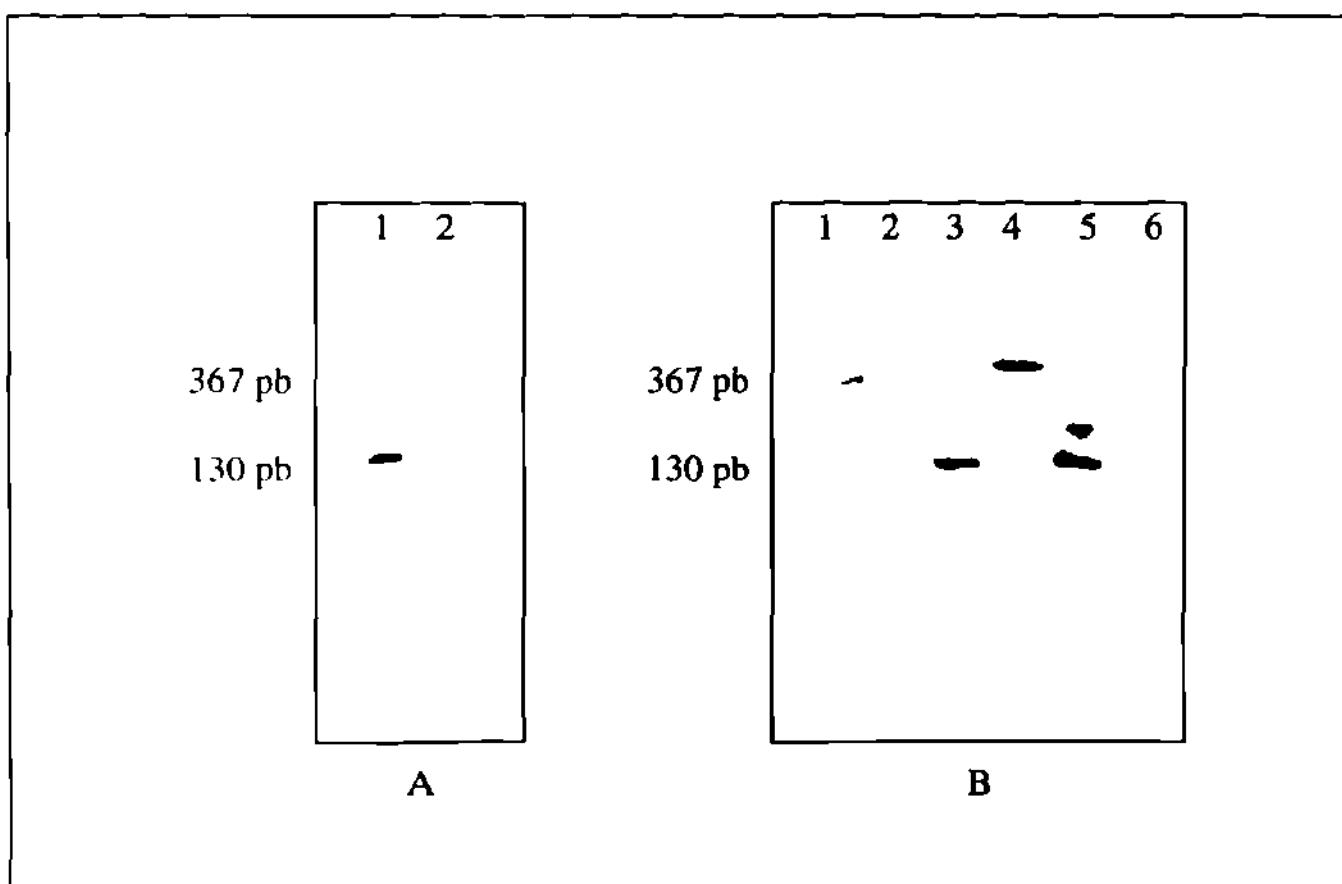


Fig. 14. Detección de los genes *cry1B* y *cry1C* en diferentes cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*.

Panel A) carril 1, HD-137 para *cry1C*; 2, HD-551 para *cry1B*.

Panel B) carril 1, HD-551; 3, HD-133; 4, GM7; 5, GM10; 6, GM34.

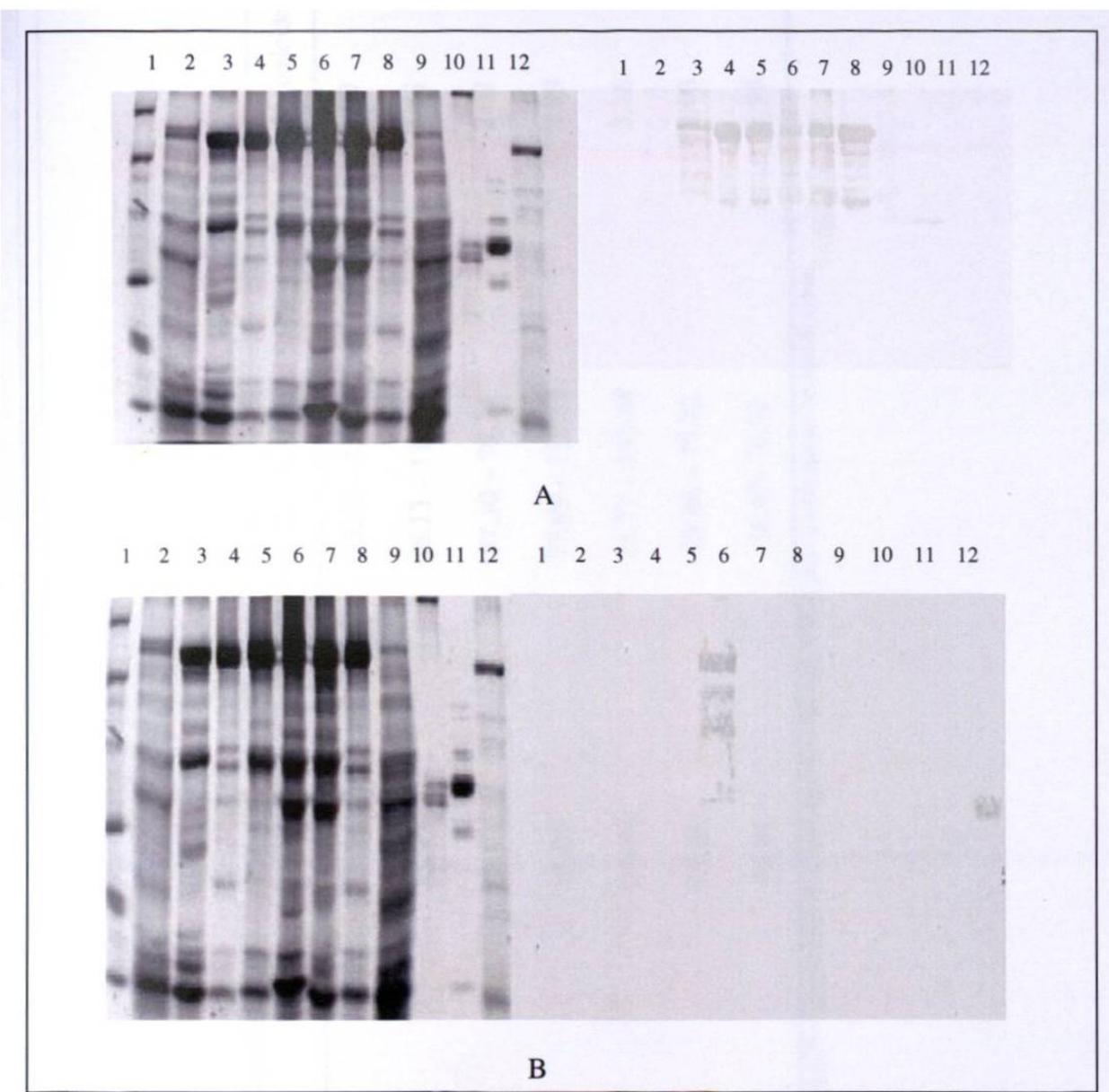


Fig. 15. Perfil de proteínas e inmunodetección de la mezcla espora-cristal de las cepas tóxicas a *D. saccharalis*. Panel A) gel de electroforesis en poliacrilamida y detección con poliantiCry1A. Carril 1, marcador de peso molecular; 2, HD-1; 3, HD-73; 4, HD-133; 5, HD-137; 6, HD-551; 7, GM7; 8, GM10; 9, GM34; 10, Cry1Ab solubilizada; 11, Cry1Ab digerida. Panel B) gel de electroforesis en poliacrilamida y detección con poliantiCry1B. Carril 6, HD-551; 12, toxina cry1B digerida.

Tabla 12. Determinación de la CL₅₀ para cepas de *B. thuringiensis* que resultaron tóxicas contra *D. saccharalis*.

Cepas de <i>B. thuringiensis</i>	CL ₅₀ *	Intervalos de confianza al 95%	Relación de toxicidad ^b
GM34	33.21	25.52 – 43.22	1.00
HD-133	85.92	66.13 – 111.65	2.58
HD-551	67.22	57.10 – 79.14	2.02
GM7	95.99	77.99 – 118.15	2.89
GM10	104.99	75.77 – 145.48	3.16
HD-133/551 ^a	67.68	58.86 – 77.82	2.03
GM10/34 *	65.91	56.47- 76.92	1.98

* μg/ml. * = mezcla de esporas y cristales, ^b = Comparación de la toxicidad entre la cepa GM34 (más tóxica) contra las demás cepas.

Tabla 13. Análisis de varianza obtenido de la comparación de los polímeros usando diferentes fagoestimulantes.

Número de Par	Comparación	ANOVA	Media No. de larvas ± ES
1	P. con fagoestimulantes vs P. sin fagoestimulantes	F=24.6526, gl=1, P≤0.01	2.22 ± 0.1005
2	P. con Coax® vs P. con caña en polvo	F=113.4801, gl=1, P≤0.01	1.47 ± 0.1293
3	P. con caña en polvo vs P. con azúcar	F=54.1671, gl=1, P≤0.01	3.96 ± 0.1952
4	P. con Coax® vs P. con azúcar	F=29.1455, gl=1, P≤0.01	2.71 ± 0.1341
5	Café de azúcar fresca ² vs Todos los soportes	F=534.9322, gl=1, P≤0.01	2.59 ± 0.1319
			8.65 ± 0.1898
			1.99 ± 0.0815

¹P= Polímeros = Capsul®, gelatina y pectina. ²Control.

Tabla 14. Comparación de medias por la prueba de Tukey para todos los soportes.

Soportes		Media del número de larvas en cada formulado ± ES
A		0.8667 ± 0.1455 ab
A1		0.5833 ± 0.1122 ^c
A2		0.8167 ± 0.1416 ^{ab}
A3		2.9167 ± 0.2962 ^d
B		1.2333 ± 0.1670 ^{abc}
B1		1.8833 ± 0.2505 ^{bcd}
B2		1.5000 ± 0.1706 ^{abc}
B3		4.8000 ± 0.3610 ^e
C		1.8000 ± 0.2314 ^b
C1		1.9500 ± 0.2382 ^{cd}
C2		1.3500 ± 0.2097 ^{abc}
C3		4.1833 ± 0.3122 ^e
D		8.6500 ± 0.1899 ^f

Ver Tabla 5 para designación de los soportes. *n = 780, valores en la columna con la misma letra no son significativamente diferentes. Tukey, P ≤ 0.05.

D = Piezas de caña de azúcar fresca utilizadas como control.

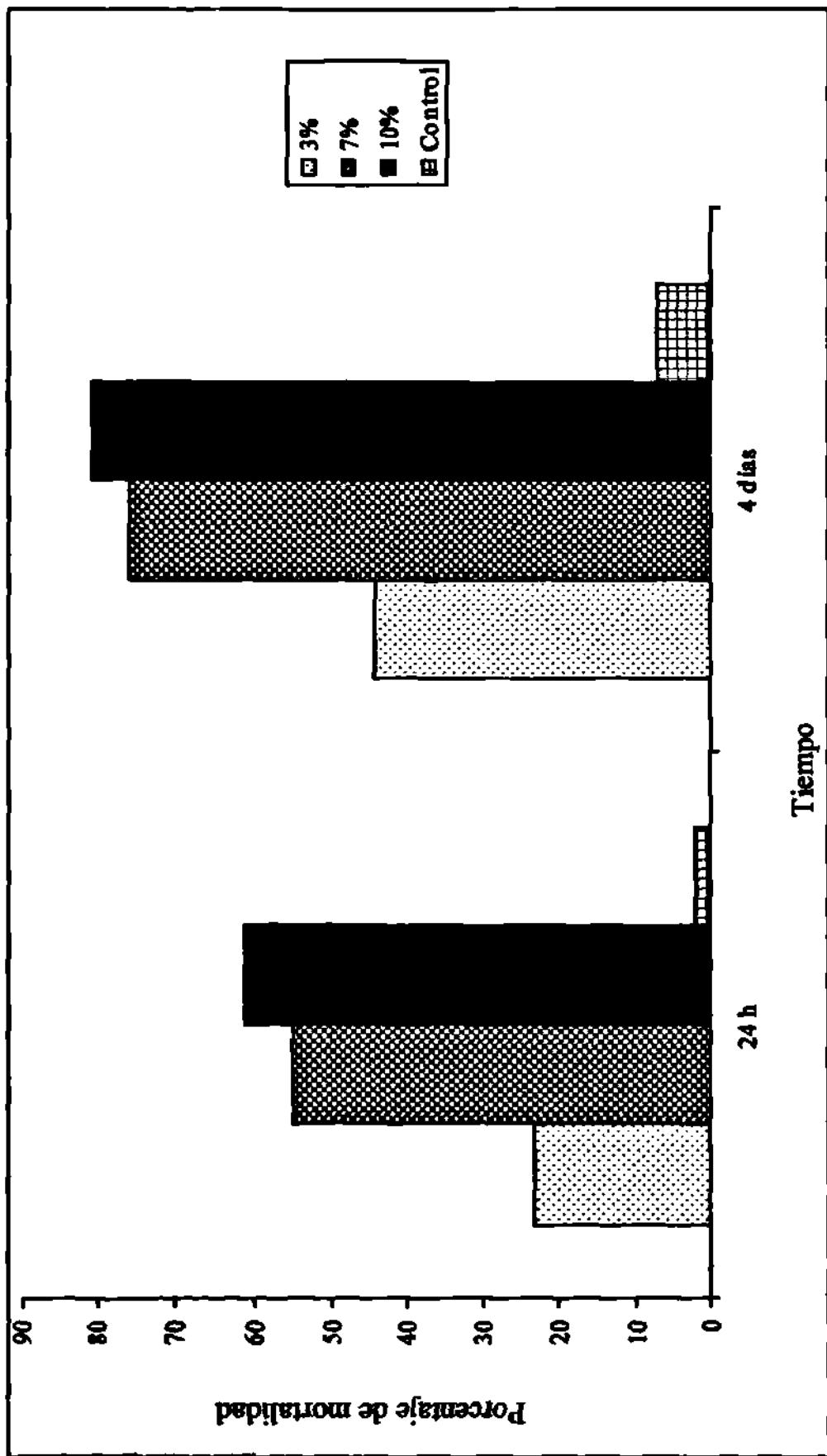


Fig. 16. Mortalidad causada a *D. saccharalis* por formulados granulares a base de la cepa GM34 de *B. thuringiensis* en bioensayos de laboratorio.

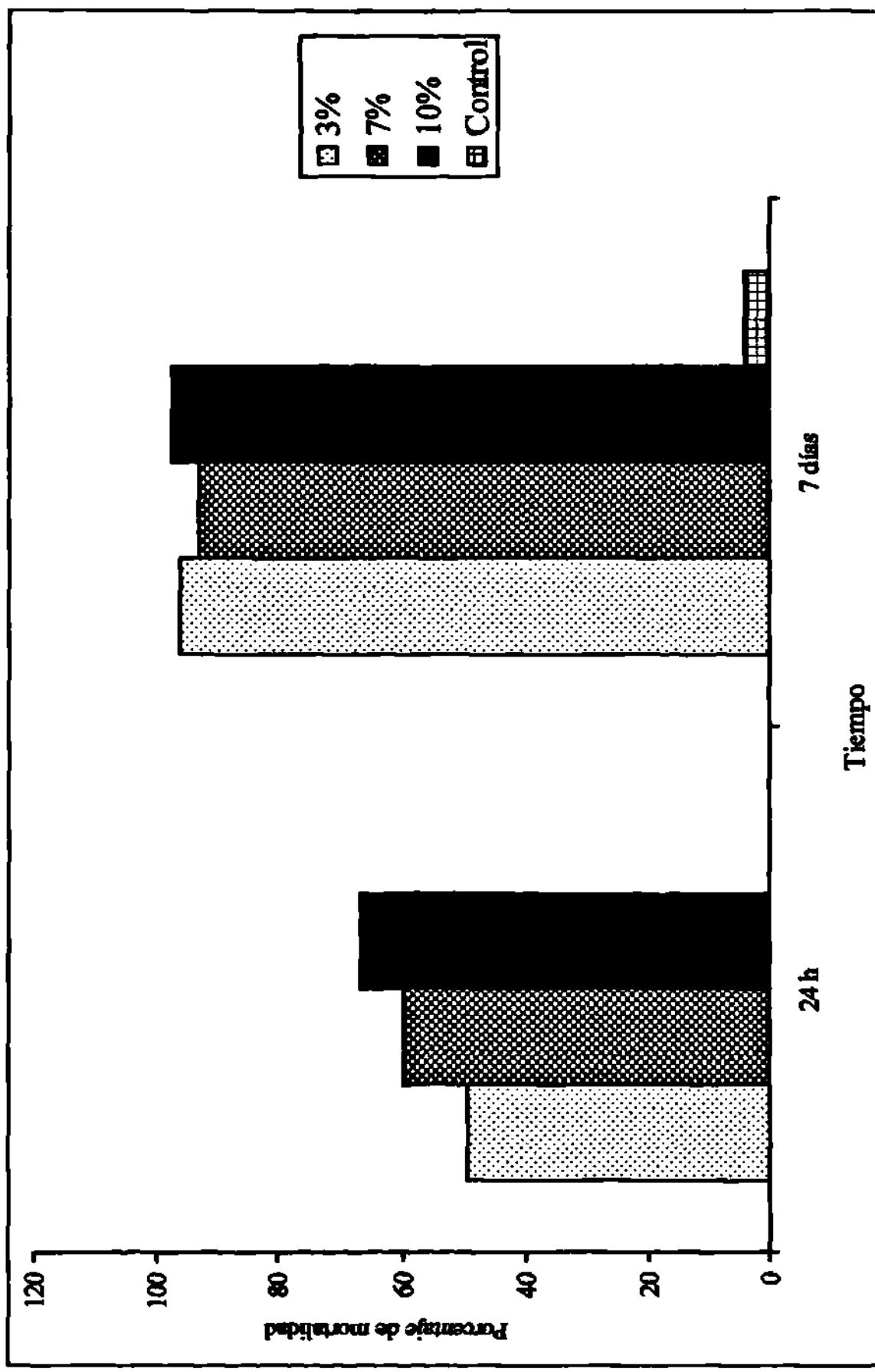
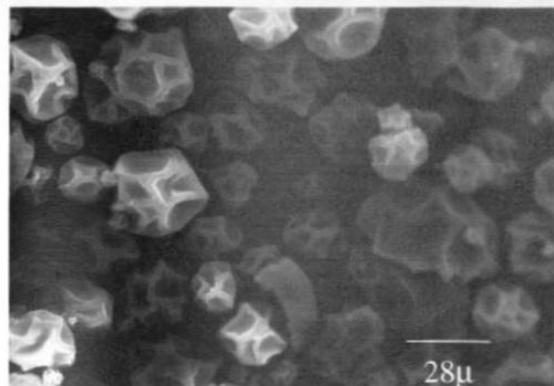
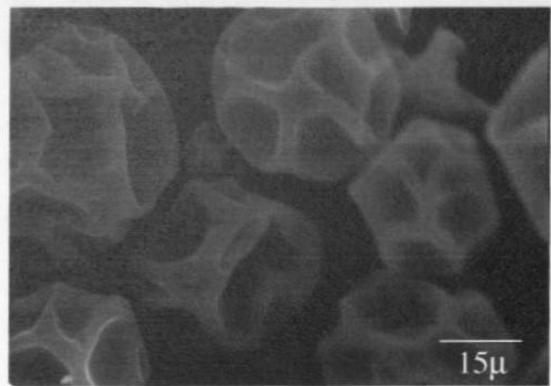


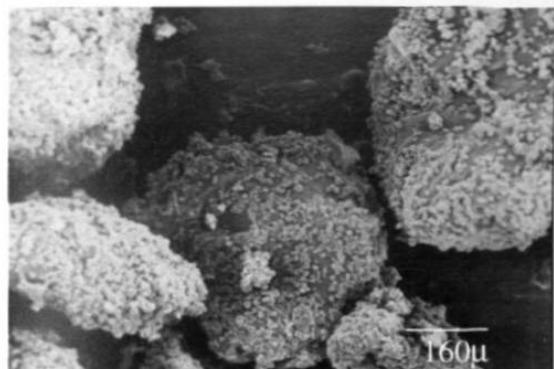
Fig. 17. Mortalidad causada a *D. saccharalis* por formulados asperjables a la base de la cepa GM34 de *B. thuringiensis* en bioensayos de laboratorio.



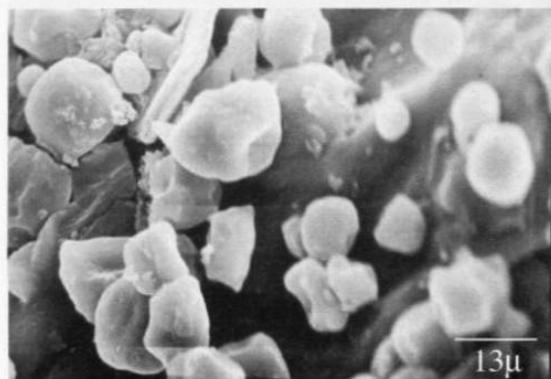
A



B



C



D

Fig. 18. Fotografías al microscopio electrónico de barrido. A) y B) corresponden al formulado asperjable al 10%. C) y D) corresponden al formulado granular al 10%.

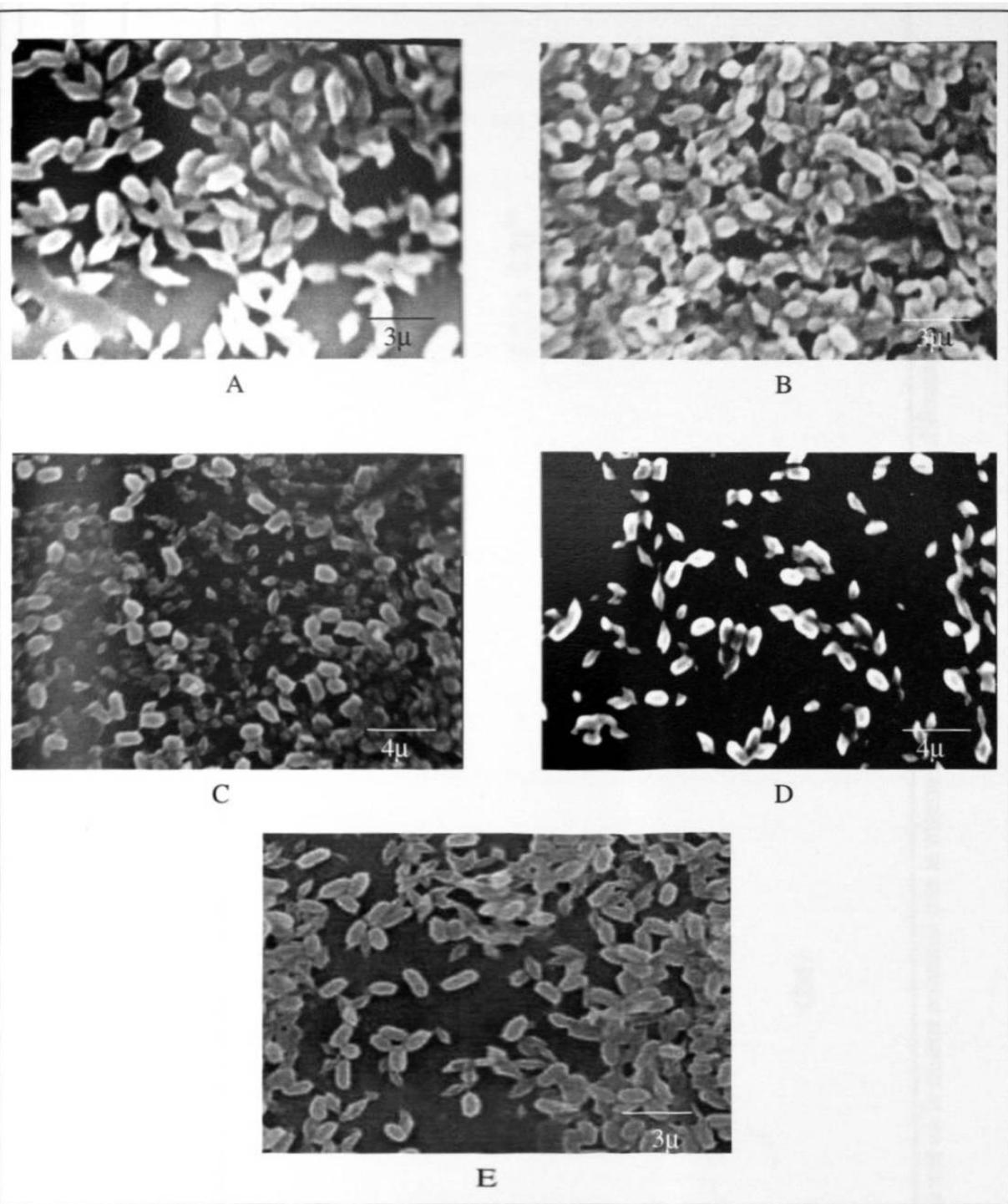


Fig. 19. Esporas y cristales de las cepas que resultaron tóxicas a *Diatraea saccharalis*, observadas al microscopio electrónico de barrido. A) cepa HD-133, B) cepa HD-551, C) cepa GM34, D) cepa GM10, y E) cepa GM7.

Tabla 15. Comparación de medias por la prueba de Tukey para el tamaño de los cristales producidos por las 5 cepas tóxicas de *B.t.* a *D. saccharalis*.

Cepa	Media del tamaño de los cristales ± ES
GM34	3.50 ± 0.85 ^a
HD-551	4.50 ± 0.17 ^{ab}
GM10	5.70 ± 0.21 ^b
HD-133	5.80 ± 0.42 ^c
GM7	7.80 ± 0.39 ^d

n = 50. Valores en la misma columna con la misma letra no son significativamente diferentes. Tukey, P ≤ 0.05.

Tabla 16. Resultados del análisis de varianza en la cantidad de cepas con daño ocasionado por barrenadores del tallo en cada unidad experimental. La Escalera, Ameca, Jal. 2001.

	0 d. d. a.	5 d. d. a.	38 d. d. a.	64 d. d. a.
Cuadrado medio del error	37.058	18.575	5.1083	2.8833
F calculada tratamientos	0.97	5.41	0.08	0.33
Probabilidad	0.4845	0.0002	0.9998	0.9575
R cuadrada	0.22514	0.61857	0.02248	0.09043
Coeficiente de variación	57.02	46.72	108.92	102.9114
Significancia entre tratamientos	No hay	Si hay	No hay	No hay

Tabla 17. Promedio de cepas dañadas por tratamiento

Tratamiento	0 d.d.a.		5 d.d.a.		38 d.d.a.		64 d.d.a.	
	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS	Media ± DS
1	11 ± 8.86	11 ± 3.56	1.75 ± 0.95	1.5 ± 1				
2	10.25 ± 5.91	13.5 ± 2.51	2.25 ± 2.63	1.25 ± 1.89				
3	10.5 ± 7.14	10 ± 2.94	1.75 ± 2.36	2.25 ± 1.70				
4	10 ± 4	16 ± 7.61	2.75 ± 3.20	2.25 ± 2.21				
5	12.25 ± 3.86	12.25 ± 5.19	1.75 ± 2.06	1.75 ± 2.21				
6	5.5 ± 4.43	12.5 ± 1.73	2.25 ± 2.87	1.25 ± 1.5				
7	17.25 ± 1.81	4.25 ± 1.5	2 ± 2.16	0.75 ± 0.95				
8	8.25 ± 0.5	4.25 ± 2.06	2 ± 2.16	2 ± 1.82				
9	10 ± 2.31	4 ± 2.16	2.25 ± 2.21	1.5 ± 1.29				
10	11.75 ± 5.73	2.5 ± 1.29	2.0 ± 0.81	2.0 ± 1.82				

Tabla 18. Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por barrenadores el día de la aplicación. La Escalera, Ameca, Jal. 2001.

Contraste	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
C1 T1 vs. T2 y T3	1	1.041	1.041	0.03	0.8680
C2 T1 vs. T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10	1	0.285	0.285	0.01	0.9306
C3 T4, T5 y T6 vs. T7, T8 y T9	1	40.041	40.041	1.08	0.3069
C4 T4 vs. T5 y T6	1	3.375	3.375	0.09	0.7649
C5 T6 vs. T4 y T5	1	84.375	84.375	2.28	0.1418
C6 T7 vs. T8 y T9	1	176.041	176.041	4.75 *	0.0373
C7 T9 vs. T7 y T8	1	20.167	20.167	0.54	0.4664
C8 T10 vs. T4, T5 y T6	1	18.750	18.750	0.51	0.4824
C9 T10 vs. T7, T8 y T9	1	0.020	0.020	0	0.9812

* Diferencia significativa ($P > 0.001$).

Tabla 19. Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por barrenadores 5 días después de la aplicación.
La Escalera, Ameca, Jal. 2001.

	Contraste	Grados de Libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado Medio	F calculada	Probabilidad
C1 T1 vs. T2 y T3		1	1.500	1.500	0.08	0.7782
C2 T1 vs. T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10		1	26.4687	26.4687	1.42	0.2419
C3 T4, T5 y T6 vs. T7, T8 y T9		1	610.0416	610.0416	32.84 **	0.0001
C4 T4 vs. T5 y T6		1	18.375	18.375	0.99	0.3279
C5 T6 vs. T4 y T5		1	18.375	18.375	0.99	0.3279
C6 T7 vs. T8 y T9		1	0.04167	0.04167	0	0.9625
C7 T9 vs. T7 y T8		1	0.167	0.167	0.01	0.9252
C8 T10 vs. T4, T5 y T6		1	414.187	414.187	22.30 **	0.0001
C9 T10 vs. T7, T8 y T9		1	8.333	8.333	0.45	0.5081

** Diferencia altamente significativa ($P < 0.001$).

**Tabla 20. Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por bartenadores 38 días después de la aplicación.
La Escalera, Ameca, Jal. 2001.**

Contraste	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
C1 T1 vs. T2 y T3	1	1.1666	1.1666	0.03	0.8579
C2 T1 vs. T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10	1	0.54017	0.54017	0.11	0.7473
C3 T4, T5 y T6 vs. T7, T8 y T9	1	0.1667	0.1667	0.03	0.8579
C4 T4 vs. T5 y T6	1	1.500	1.500	0.29	0.5919
C5 T6 vs. T4 y T5	1	0.0	0.0	0.0	1.000
C6 T7 vs. T8 y T9	1	0.041667	0.041667	0.01	0.9286
C7 T9 vs. T7 y T8	1	0.1667	0.1667	0.03	0.8579
C8 T10 vs. T4, T5 y T6	1	0.1875	0.1875	0.04	0.8494
C9 T10 vs. T7, T8 y T9	1	0.0208	0.0208	0.0	0.9495

Tabla 21. Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por barrenadores 64 días después de la aplicación.
La Escalera, Ameca, Jal. 2001.

	Contraste	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Probabilidad
C1 T1 vs. T2 y T3		1	0.1667	0.1667	0.06	0.8116
C2 T1 vs. T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10		1	0.0714	0.0714	0.02	0.8760
C3 T4, T5 y T6 vs. T7, T8 y T9		1	0.666	0.666	0.23	0.6341
C4 T4 vs. T5 y T6		1	1.50	1.50	0.52	0.4763
C5 T6 vs. T4 y T5		1	1.50	1.50	0.52	0.4763
C6 T7 vs. T8 y T9		1	2.667	2.667	0.92	0.3439
C7 T9 vs. T7 y T8		1	0.0416	0.0416	0.01	0.9051
C8 T10 vs. T4, T5 y T6		1	0.1875	0.1875	0.07	0.8005
C9 T10 vs. T7, T8 y T9		1	1.0208	1.0208	0.35	0.5563



A



B



C



D



E



F

Fig. 20. Presencia de *Diatraea saccharalis* y muestra de los daños causados en el cultivo de caña de azúcar seleccionado para las pruebas de campo. La presencia de *D. saccharalis* favorece la aparición del muermo rojo *Physalospira tucumanensis*.



A



B



C



D



E



F

Fig. 21. Cultivo de caña de azúcar y su procesamiento. A) caña en crecimiento, B) caña de 12 meses de edad, apta para procesamiento, C) quema de la caña y D), E) y F) corte, recolección y procesamiento en el ingenio.

DISCUSIÓN

Diatraea saccharalis es el barrenador del tallo de la caña de azúcar y se le ha considerado como la plaga más importante de este cultivo (Meagher *et al.*, 1998). En nuestro país, ha causado graves problemas, principalmente en las regiones de Sinaloa y Las Huastecas, en donde las infestaciones alcanzan índices hasta de 30% de canutos barrenados. Bajo estas condiciones se estima que las pérdidas producidas pueden ser cuantiosas, considerando que arriba del 15% se cataloga como grado de infestación alto. Su combate ha representado uno de los principales problemas, debido a que casi la totalidad del período larval lo pasa en el interior de los tallos de la caña, protegiéndose de esta manera de las condiciones climáticas y de los insecticidas. A través de los últimos 40 años se han realizado importantes esfuerzos para encontrar alternativas viables para el control de esta plaga, sin embargo los resultados han sido muy pobres. Para la introducción de una alternativa viable, es necesario la investigación continua, lo que hace imprescindible una cría masiva del insecto en estudio, en este caso *D. saccharalis*. La cría masiva que se obtuvo en el laboratorio proporcionó el número de larvas suficientes para todos los bioensayos requeridos. Debido a que las condiciones para la cría fueron mejoradas, ya que la adición de una mayor cantidad de azúcar permitió que éstas se alimentaran más y una mayor cantidad de agar mejoró la consistencia firme de la dieta, facilitando la formación de los túneles, dentro de los cuales las larvas viven la mayor parte de su vida, se logró obtener una generación al mes, lo cual proporcionó disponibilidad del insecto para las pruebas necesarias, además representó una ventaja comparado con las poblaciones naturales que se presentan 4 ó 5 veces al año (Legaspi *et al.*, 1984).

Las 12 cepas de *B. thuringiensis* que se probaron contra *D. saccharalis*, mostraron variaciones en la mortalidad causada, de éstas fueron seleccionadas cinco, entre las cuales no hubo diferencia significativa respecto a la mortalidad, pero la CL₅₀ fue variable y se seleccionó la de menor valor que en este caso correspondió a la cepa GM34.

Existe una relación de la toxicidad con la presencia de los genes *cry* y las proteínas que sintetiza una cepa hacia un insecto específicamente. Algunos autores reportan que la toxicidad de cepas de *B. thuringiensis* hacia larvas de *Diatraea*, se debe a las toxinas Cry1B

(Bohorova *et al.*, 1997) o Cry1C (Aranda *et al.*, 1998.), pero en estos estudios se utilizaron las toxinas puras, mientras que en nuestro estudio se trabajó con el complejo espora-cristal, en donde el insecto estuvo posiblemente sometido a la acción de varias toxinas Cry, además de que la presencia de las esporas pudo aumentar la actividad de la toxina, así como ya se ha reportado en algunos otros insectos (Miyasono *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1998; Karamanlidou *et al.*, 1991).

De acuerdo al análisis genético realizado, las cepas con actividad tóxica albergan genes de los tipos *cry1A*, *cry1B* y *cry1C*. Las cepas tóxicas como la HD-133 y la GM10 albergan el gen *cry1C*, la HD-551 y la GM7 albergan el gen *cry1B*, estos resultados concuerdan parcialmente con los resultados obtenidos por Bohorova y col. (1997) y Aranda y col. (1998), en cuanto a que la toxicidad de nuestras cepas posiblemente deriva de estos genes, sin embargo no se determinó si la toxicidad deriva de los genes *cry1B* o *cry1C* precisamente o es el resultado de la expresión de los genes *cry1A*, ya que por lo menos 2 subtipos de este gen están presentes en todas las cepas tóxicas. Arencibia y col. (1997) (citado por González-Cabrera, 2001), indica que la caña de azúcar transgénica expresa la toxina Cry1Ab de *B. thuringiensis* y ésta tiene su acción sobre *D. saccharalis*, nuestros resultados están más acordes con este reporte ya que las 5 cepas tóxicas albergan genes *cry1Ab*; por lo tanto la actividad tóxica de estas cepas puede provenir de este gen y no necesariamente derivarse de la expresión de los genes *cry1C* o *cry1B*, esto puede corroborarse en la cepa GM7, la cual alberga el gen *cry1B*, de acuerdo a la amplificación por PCR, pero no expresa la proteína Cry1B, por lo que la toxicidad de esta cepa no depende de este gen.

Por otra parte, Reed y Halliday, (2001) reportaron que la toxina Cry9C es tóxica a *Diatraea grandiosella*, al ser nuestro insecto del mismo género, es cuestionable si la toxicidad de las cepas proviene de algún otro gen diferente a los que se detectaron, la posibilidad queda abierta, sin embargo se considera que la toxicidad de estas cepas está ampliamente relacionada con la presencia de los genes Cry1A.

El éxito de una formulación dependerá de la cepa seleccionada de *B. thuringiensis* y de un acarreador o soporte que sea ampliamente aceptado por las larvas. Muchos tipos de polímeros han sido involucrados en el desarrollo de formulaciones, incluyendo el uso de

fagoestimulantes, ya que la adición de éstos aumenta grandemente las posibilidades de éxito del mismo (Bell y Romine, 1980), al ser dirigidos para obtener una formulación adecuada y aceptable para la plaga en cuestión. Para encontrar la combinación de ingredientes, desarrollamos soportes granulares, sin el ingrediente activo para *D. saccharalis*. Los resultados mostraron que la presencia de los fagoestimulantes incrementó la ingestión por parte de la larva. Se observó que las larvas prefirieron fuertemente los soportes B3 y C3 y la aceptación de estos soportes granulares fue evidente cuando se compararon contra el resto. Aunque el soporte C3 fue ampliamente aceptado por las larvas, el más adecuado resultó ser el B3, debido a que la gelatina es un ingrediente económico, ampliamente disponible y fácil de usar. En los resultados observamos que los acarreadores inertes utilizados en la elaboración de los soportes afectaron en cierta proporción la ingestión por parte de las larvas, ya que ellas se alimentaron muy poco de los gránulos que contenían solamente Capsul® y prefirieron ampliamente los gránulos que contenían gelatina y pectina combinados con el Capsul®. La caña de azúcar en polvo y el azúcar actuaron como fagoestimulantes en este estudio, pero el fagoestimulante comercial Coax® no mostró los resultados esperados con *D. saccharalis* ya que el Coax® se ha reportado como un fagoestimulante efectivo en diversas formulaciones utilizadas contra insectos lepidópteros (Bartelt *et al.*, 1990; Ridgway *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1994), sin embargo, *D. saccharalis* tuvo una respuesta muy baja hacia el Coax®.

El azúcar utilizado como fagoestimulante mostró una palatabilidad intermedia para *D. saccharalis*. Bartelt y col. (1990), reportaron que la glucosa causa un incremento significativo en la palatabilidad de las larvas de *Ostrinia nubilalis*, mientras que el follaje de maíz biofilizado causó una actividad intermedia, Gillispie y col. (1994) reportaron que las larvas de *Ostrinia nubilalis* prefirieron las formulaciones que contenían hojas de algodón, mientras que las melazas causaron una palatabilidad intermedia en este insecto, sin embargo ambos autores concuerdan en que la formulación más aceptada fue la que incluía Coax® como fagoestimulante. En este estudio las larvas de *D. saccharalis* aceptaron aquellos soportes que contenían caña de azúcar en polvo, el azúcar causó una palatabilidad intermedia, este resultado concuerda con Bartelt y col. (1990) y Gillispie y col. (1994), sin embargo en el caso específico de *Diatraea saccharalis*, el Coax® no mostró los resultados

esperados, porque fue el menos aceptado. Esto sugiere que diversos insectos estén relacionados a la misma familia, tienen distintas preferencias alimenticias, por lo que es necesario hacer un estudio de la amplia variedad de aditivos existentes para mejorar la selección de la formulación más adecuada para facilitar la ingestión por la larva.

El almidón de maíz modificado, Capsul® protege la actividad insecticida y proporciona una vida de anaquel aceptable. Sin embargo, el almidón no es tan aceptado por las larvas como otros acarreadores inertes en diversas formulaciones, pero la combinación de almidón de maíz modificado y gelatina es una buena opción en el desarrollo de una formulación.

Además, la utilización de productos agrícolas de desecho, como remanentes de caña de azúcar pueden ser usados para diseñar una formulación adecuada y económica. .

Sin embargo la selección del fagoestimulante va a depender en gran medida del insecto y de sus hábitos alimenticios.

Los formulados ya preparados en base a los polímeros, fagoestimulantes y cepa adecuados fueron probados a nivel de laboratorio, en donde se observó un resultado exitoso, ya que la mortalidad fue superior al 80% para la dosis del granular al 10% y en el caso de los asperjables fue aún mejor ya que causó una mortalidad cercana al 100% con las 3 dosis, estos resultados alentaron la continuación de los estudios de estos formulados a nivel de campo.

Las especies encontradas en campo fueron *Eoreuma loftini* y *D. considerata*. Ante *E. Loftini* no se tiene reporte de la efectividad de *B. thuringiensis*, pero es una plaga de alta incidencia en el estado de Jalisco (Legaspi *et al.*, 2000) En este estudio las dos especies de barrenadores estuvieron presentes como un complejo, por lo que se considera que el efecto registrado en la mortalidad de las larvas y en la incidencia de daños en tallos, por parte de *B. thuringiensis* probablemente fue sobre *Diatraea considerata* solamente.

Uno de los factores más importantes, en el caso de este cultivo, es que las aplicaciones se realicen en el tiempo adecuado, es decir, cuando se observen huevecillos o larvas de 1^a o 2^a instar, otros trabajos han reportado situaciones similares y las formulaciones han sido exitosas y se ha observado que el efecto óptimo ocurre cuando las larvas pequeñas son el estado predominante (Zehnder y Gelernter, 1989).

Respecto a los formulados asperjables, la dosis al 3% tuvo significativamente menor efectividad con respecto a las dosis media y alta del asperjable, uno de los factores que influyó en el éxito de esta formulación, es que fácilmente recubre el follaje de la planta, quedando ésta bien protegida. Los tratamientos granulares tuvieron los niveles de daño más altos, superando incluso al testigo sin aplicación, estos resultados pueden deberse a varias causas, una de ellas es, posiblemente, la falta de adherencia del gránulo a la hoja de la planta, esto pudo causar que las larvas se alimentaran del gránulo por un breve período de tiempo, durante el cual el gránulo permaneció en la hoja, antes de ser arrastrado por el viento o lavado por la lluvia, como se ha observado en otras formulaciones granulares (McGuire y Shasha, 1992) evitando de esta manera que las larvas ingirieran dosis letales y provocando que la larva barrenara, otra causa posible es que las parcelas no hayan presentado una infestación homogénea y que algunas parcelas tuvieran una mayor incidencia de larvas, otra cuestión importante es la cantidad de tallos a los que se debe de aplicar, lo cual en el caso de caña, retrasa las labores; otro factor es la falta de tecnología disponible para aplicar formulados granulares, debido a que tiene que realizarse con salero y en el caso de la caña es completamente impráctico, además en este tipo de cultivo los tallos no están ubicados en fila sobre el surco, esto dificulta cualquier labor con equipo de aplicación. Debe considerarse el uso de adherentes para mejorar estas formulaciones.

El formulado asperjable mostró características adecuadas para ser utilizado en campo y competir con los insecticidas comerciales. El testigo comercial utilizado fue el Lepinox que es un insecticida elaborado a base de una cepa de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, la cepa de nuestro formulado pertenece a la misma variedad, en este aspecto existe cierta igualdad, pero difieren en que el formulado comercial está elaborado a una dosis más alta (15%), esto da ventaja al formulado asperjable, introduciendo una nueva alternativa en el control de esta plaga, además se observó que la persistencia en campo para el formulado asperjable fue de 5 días, comparado con 2 o 3 días de persistencia en otras formulaciones. De acuerdo con estudios realizados por Arévalo-Niño, (1990), la cepa GM34 no sintetiza la β -exotoxina, también llamada thuringiensina, que es una molécula soluble tóxica de un espectro mucho más amplio ya que también es activa contra mamíferos, esta circunstancia, además de la posibilidad de que tengan también efectos mutagénicos, hace que los aislados

que las contienen no sean deseables para su inclusión en formulaciones insecticidas (Iriarte y Caballero, 2001), esto le proporciona una ventaja aún mayor para su posible producción comercial.

CONCLUSIONES

- ◆ La implementación de la cría masiva de *Diatraea saccharalis* fue exitosa.
- ◆ El análisis de PCR es una herramienta básica para detectar la presencia de los genes *cry*, los cuales están directamente relacionados con la toxicidad de la cepa y su presencia proporciona especificidad.
- ◆ La detección de las proteínas Cry mediante immunodetección puede utilizarse como una herramienta útil en la selección de cepas con actividades tóxicas específicas.
- ◆ La selección de una cepa con actividad tóxica específica hacia un insecto en particular, *D. saccharalis* en nuestro caso, junto con los soportes adecuados asegura el éxito de la formulación.
- ◆ La cepa GM34, no obstante a ser una cepa nativa, proveniente de una región no cañera, mostró una alta toxicidad hacia *D. saccharalis*.
- ◆ El formulado elaborado fue ampliamente aceptado por las larvas.
- ◆ El uso de un fagoestimulante adecuado incrementa grandemente la toxicidad de un formulado.
- ◆ Los formulados tanto granulares como asperjables resultaron muy exitosos a nivel de laboratorio.
- ◆ El formulado asperjable a la dosis del 10% aplicado en campo, es tan eficiente como un formulado comercial y es altamente competitivo ya que posee una dosis menor.
- ◆ El uso de formulados granulares no es recomendable para el cultivo de caña de azúcar.

SUGERENCIAS PARA PRÓXIMAS INVESTIGACIONES

- ◆ Realizar pruebas de adherencia al formulado efectivo.
- ◆ Determinar con mayor exactitud la residualidad del formulado efectivo.
- ◆ Evaluar la eficacia de otros fagoestimulantes al ser incorporados al formulado.
- ◆ Probar los fagoestimulantes a diferentes concentraciones para optimizar la aceptación del formulado.
- ◆ Probar diferentes concentraciones de los polímeros para mejorar la recuperación después del secado por aspersión.
- ◆ Incluir en el formulado protectores de luz UV con la finalidad de aumentar la residualidad en campo.
- ◆ Mejorar la adherencia de los formulados granulares y optimizar su aplicación en campo para el cultivo de caña de azúcar.
- ◆ Utilizar los soportes y fagoestimulantes para otros agentes bioinsecticidas.
- ◆ Probar el formulado con otros insectos blanco.
- ◆ Completar el perfil de los genes *cry1* para las cepas tóxicas.
- ◆ Investigar más ampliamente la presencia de otros genes *cry* que puedan estar relacionados con la toxicidad de las cepas.
- ◆ Hacer un estudio de factibilidad económica para la posible producción comercial del formulado.

LITERATURA CITADA

Abel, C. A., R. L. Wilson, B. R. Wiseman, W. H. White y F. M. Davis. 2000. Conventional resistance of experimental maize lines to corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae), fall armyworm (Lepidoptera: Noctuidae), southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae), and sugarcane borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 982-988.

Agaise, H. y D. Lereclus. 1995. How does *Bacillus thuringiensis* produce so much insecticidal crystal protein?. *J. Bacteriol.* 177: 6027-6032.

Aizawa, K. 1974. Selection and utilization of *Bacillus thuringiensis* strains for microbial control. 1st. Intersectional Congress of the International Association of Microbiological Societies. Tokio. 1-10.

Aranda, E., J. Sánchez, L. Lina, M. Peferoen y A. Bravo. 1998. Análisis de la unión *in vitro* e *in vivo* de las δ-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* al epitelio intestinal medio de *Diatraea grandiosella* (Lepidotera:Pyralidae). *BioTecnología*. 3: 95-105.

Arencibia, A., R. Vázquez, D. Prieto, P. Téllez, E. Carmona, A. Coego, L. Hernández, G. De la Riva y G. Selman-Housein. 1997. Transgenic sugarcane plants resistant to stem-borer attack. *Molecular Breeding*. 3: 247-255.

Arévalo-Niño, K. 1990. Implementación de un método para detección de β-exotoxina en cepas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría. UANL. FCB. División de Estudios de Postgrado. Monterrey, N.L. México.

Aronson, A. 1995. The protoxin composition of *Bacillus thuringiensis* insecticidal inclusions affects solubility and toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4057-4060.

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

Aronson, A. I., C. Geng y L. Wu. 1999. Aggregation of *Bacillus thuringiensis* Cry1A toxins upon binding to target insect larval midgut vesicles. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2503-2507.

Bai, C., D. Degheele, S. Jansens y B. Lambert. 1993. Activity of insecticidal crystal proteins and strains of *Bacillus thuringiensis* against *Spodoptera exempta* (Walker). *J. Invertebr. Pathol.* 62: 211-215.

Ballester, V., F. Granero, R. A. de Maagd, D. Bosch, J. L. Ménsua y J. Ferré. 1999. Role of *Bacillus thuringiensis* toxin domains in toxicity and receptor binding in the diamondback moth. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 5: 1900-1903.

- Bartelt, R. J., M. R. McGuire y D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 19: 182-189.
- Bauer, L. S. 1995. Resistance: A treat to the insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Florida Entomologist. 78: 424-443.
- Bauer, L. S. y H. S. Pankratz. 1992. Ultrestructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. J. Invertebr. Pathol. 60: 15-25.
- Baum, J. A., D. M. Coyle, M. P. Gilbert, C. S. Jany y C. Gawron-Burke. 1990. Novel cloning vectors for *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 3420-3428.
- Baum, J. A., M. Kakefuda y C. Gawron-Burke. 1996. Engineering *Bacillus thuringiensis* bioinsecticides with an indigenous site-specific recombination system. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4367-4373.
- Behle, R. W., M. R. McGuire, R. L. Gillespie y B. S. Shasha. 1997. Effects of alkaline gluten on the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 90: 354-360.
- Behle, R. W., M. R. McGuire y B. S. Shasha. 1996. Extending the residual toxicity of *Bacillus thuringiensis* with casein-based formulations. J. Econ. Entomol. 89: 1399-1405.
- Behle, R. W., M. R. McGuire y B. S. Shasha. 1997. Effects of sunlight and simulated rain on residual activity of *Bacillus thuringiensis* formulations. J. Econ. Entomol. 90: 1560-1566.
- Bell, M. R. y C. L. Romine. 1980. Tobacco budworm field evaluation of microbial control in cotton using *Bacillus thuringiensis* and a nuclear polyhedrosis virus with a feeding adjuvant. J. Econ. Entomol. 73: 427-430.
- Ben-Dov E., Q. Wang, A. Zaritsky, R. Manasherob, Z. Barak, B. Schneider, A. Khamraev, M. Baizhanov, V. Glupov y Y. Margalith. 1999. Multiplex PCR screening to detect *cry9* genes in *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 65: 3714-3716.
- Benoit, T.G., G. R. Wilson, D. L. Bull y A. I. Aronson. 1990. Plasmid-associated sensitivity of *Bacillus thuringiensis* to UV light. App. Environ. Microbiol. 56: 2282-2286.
- Bentur, J. S., D. A. Andow, M. B. Cohen, A. M. Romena y F. Gould. 2000. Frequency of alleles conferring resistance to a *Bacillus thuringiensis* toxin in a Philippine population of *Scirpophaga incertulas* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 93: 1515-1521.
- Bhattacharya, M., B. A. Plantz, J. D. Swanson-Kobler y K. W. Nickerson. 1993. Nonenzymatic glycosylation of lepidopteran-active *Bacillus thuringiensis* protein crystals. Appl. Environ. Microbiol. 59: 2666-2672.

Biellot, H., P. R. Carey, C. Choma, H. Kaplan, T. Lessard y M. Pozsgay. 1989. Facile preparation and characterization of the toxin from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. Biochem J. 260: 87-91

Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A. M. Maciel, R. M. Brito, D. Hoisington y A. Bravo. 1997. Susceptibility of four tropical lepidoperan maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. J. Econ. Entomol. 90: 412-415.

Bolin, P. C., W. D. Hutchison y D. A. Andow. 1999. Long-term selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. 92: 1021-1030.

Bora, R. S., M. G. Murty, R. Shenbagarathai y V. Sekar. 1994. Introduction of a lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phyllosphere. Appl. Environ. Microbiol. 60: 214-222.

Borgonie, G., R. Van Driessche, F. Leyns, G. Arnaut, D. De Waele y A. Coomans. 1995. Germination of *Bacillus thuringiensis* spores in bacteriophagus nematodos (Nematoda: Rhabditida). J. Invertebr. Pathol. 65: 61-67.

Bounet, A. 1983. Nota relativa al control biológico de taladradores del tallo de la caña de azúcar. Boletín semestral de la Comisión de Protección Fitosanitaria para el Caribe. Oficina regional de la FAO para la América Latina. Vol. XII. No. 2. La Martinica.

Bourgouin, C., A. Deléchuse, F. De la torre y J. Szulmajster. 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus thuringiensis* sphearicus into *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and their expression. Appl. Environ. Microbiol. 56: 340-344.

Bourque, S. N., J. R. Valéro, J. Mercier, M. C. Lavoie y R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 523-527.

Bradley, D., M. A. Harkey, M. K. Kim, K. D. Biever y L. S. Bauer. 1995. The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. J. Invertebr. Pathol. 65: 162-173.

Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin family proteins and their functional domains. J. Bacteriol. 179: 2793-2801.

Bravo A., K. Hendrickx, S. Jansens y M. Peferoen. 1992. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. J. Invertebr. Pathol. 60: 247-253 (a).

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

Bravo, A., S. Sarabia, L. López, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Peña, M. E. Núñez-Valdez, M. Soberón y R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4965-4972.

Brewer, G. J. y M. D. Anderson. 1990. Modification of the effect of *Bacillus thuringiensis* on sunflower moth (*Lepidopera:Pyralidae*) by dietary phenols. *J. Econ. Entomol.* 83: 2219-2224.

Brousseau, R., A. Saint-Onge, G. Préfontaine, L. Masson y J. Cabana. 1993. Arbitrary primer polymerase chain reaction, a powerful method to identify *Bacillus thuringiensis* serovars and strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 114-119.

Bull, D. L., R. L. Ridgway, V. S. House y N. W. Pryor. 1976. Improved formulations of the *Heliothis* nuclear polyhedrosis virus. *J. Econ. Entomol.* 69: 731-736.

Canale, R., 1998. Agrobiosol: Ecología y Economía, pp. 8-13. *En Productores de Hortalizas.*

Carozzi, N. B., V. C. Kramer, G. W. Warren, S. Evola y M. G. Koziel. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061.

Cerón, J. A. 2001. Productos comerciales nativos y recombinantes a base de *Bacillus thuringiensis*, pp 153-168. *En. Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas.* P. Caballero y J. Ferré [ed]. M .V. Phytoma-España, S.L. España.

Cerón J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina y A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Entomol.* 60: 353-356.

Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Güereca y A. Bravo. 1995. Specific PCR primers directed to identify *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Entomol.* 61: 3826-3831.

Chak, K.-F., D.-C. Chao, M.-Y. Tseng, S.-S. Kao, S.-J. Tuan y T.-Y. Feng. 1994. Determination and distribution of *cry*-types genes of *Bacillus thuringiensis* isolates from Taiwan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2415-2420 (a).

Chak, K.-F., M.-Y. Tseng y T. Yamamoto. 1994. Expresión de la proteína cristalina del gen cryIVD bajo el control del promotor de la amilasa α en *Bacillus thuringiensis* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2304-2310.(b).

Chang, C., S.-M. Dai, R. Frutos, B. A. Federici y S. S. Gill. 1992. Properties of a 72-Kilodalton mosquitocidal protein from *Bacillus thuringiensis* subsp. *morrisoni* PG-14 expressed in *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* by using the shuttle vector pHT3101. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 507-512.

Chang, C., Y.-M. Yu, S.-M. Dai, S. K. Law y S. S. Gill. 1993. High level *cryIVD* and *cytA* gene expression in *Bacillus thuringiensis* does not require the 20-Kilodalton protein and the coexpressed gene products are synergistic in their toxicity to mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 815-821.

Cheng, P., L. Wu, Y. Ziniu y A. Aronson. 1999. Subspecies-dependent regulation of *Bacillus thuringiensis* protoxin genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1849-1853.

Chilcutt, C. F. y B. E. Tabashnik. 1999. Simulation of integration of *Bacillus thuringiensis* and the parasitoid *Cotesia plutellae* (Hymenoptera: Braconidae) for control of susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Environ. Entomol.* 28: 505-512.

Crickmore, N., D. R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum y D. H. Dean. 1998. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 807-813.

Davison, R. H. 1992. Plagas de pastos y cereales, pp 189-207. En Plagas de Insectos Agrícolas y del Jardín. Noriega [ed.]. Limusa. México.

Delécluse A., M.-L. Rosso y A. Ragni. 1995. Cloning and expresión of a novel toxin gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* encoding a highly mosquitocidal protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4230-4235.

Denolf, P., S. Jansens, M. Peferoen, D. Degheele y J. Van Rie. 1993. Two different *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin receptor in the midgut brush border membrane of the European corn borer, *Ostrinia nubilalis* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1828-1837. (a).

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

Dervyn, E., S. Poncet, A. Klier, y G. Rapoport. 1995. Transcriptional regulation of the *cryIVD* gene operon from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *J. Bacteriol.* 177: 2283-2291.

Dethier, V. G., L. B. Browne y C. N. Smith. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects. *J. Econ. Entomol.* 53: 134-136.

Du, C., P. A. W. Martin y K. W. Nickerson. 1994. Comparison of disulfide contents and solubility at alkaline pH of insecticidal and noninsecticidal *Bacillus thuringiensis* protein crystals. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3847-3853.

Du, C y K. W. Nickerson. 1996. The *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxin binds biotin-containing proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2932-2939.

Dulmage, H. T., J. A. Correa y A. J. Martinez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 15-20.

Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol.* 17: 120-126.

Estada, U. y J. Ferré. 1994. Binding of insecticidal crystal protein of *Bacillus thuringiensis* to the midgut brush border of the cabbage looper, *Trichoplusia ni* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae), and selection for resistance to one of the crystal proteins. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 3840-3846.

Farrar, R. R. y R. L. Ridgway. 1994. Comparative studies of the effects of nutrient-based phagostimulants on six lepidopterous insect pests. *J. Econ. Entomol.* 87: 44-52.

Federici, B. A. y L. S. Bauer. 1998. Cyt1Aa protein of *Bacillus thuringiensis* is toxic to the cottonwood leaf beetle, *Chrysomela scripta*, and suppresses high levels of resistance to Cry3Aa. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 4368-4371.

Ferro, D. N. y W. D. Gelernter. 1989. Toxicity of a new strain of *Bacillus thuringiensis* to colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 750-755.

Fluza, L.-M., C. Nielsen-Leroux, E. Gozé, R. Frutos y J.-F. Charles. 1996. Binding of *Bacillus thuringiensis* Cry1 toxins to the midgut brush border membrane vesicles of *Chilo suppressalis* (Lepidoptera: Pyralidae): Evidence of shared binding sites. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1544-1549.

Fravel, D. R., J. J. Marois, R. D. Lumsden, R. D. y W. J. Connick, Jr. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginic clay-matrix. *Phytopathology.* 75: 774-777.

Galán Wong, L.J. 1993. Selección de cepas nativas y de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra *Trichoplusia ni* (Hubn), *Heliothis virescens* (Fabricius) (Lepidoptera:Noctuidae). Tesis de Doctorado en Ciencias con especialidad en Microbiología. F.C.B. División de Estudios de Postgrado. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.

Galán-Wong, L. J., C. F. Sandoval-Coronado, K. Arévalo-Niño, C. Rodríguez-Padilla y H. A. Luna-Olvera. 1994. Evaluación de cepas nativas y de colección de *Bacillus thuringiensis* serotipo H8 contra larvas de lepidópteros. *Southwestern Entomologist.* 19: 301-307.

Garczynski, S. F., J. W. Crim y M. J. Adang. 1991. Identification of putative insect brush border membrane-binding molecules specific to *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin by protein blot analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2816-2820.

Gibson, D. M., L. G. Gallo, S. B. Krasnoff, y R. E. B. Ketchum. 1995. Increased efficacy of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in combination with tannic acid. *J. Econ. Entomol.* 8: 270-277.

Gill, S. S., E. A. Cowles y P. V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. *Annu. Rev. Entomol.* 37: 615-636.

Gillespie, R. L., M. R. McGuire y B. S. Shasha. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera:Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 87: 452-457.

González-Cabrera. J. 2001. Plantas transgénicas con la capacidad insecticida de *Bacillus thuringiensis*, pp. 169-187. *En Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de Bacillus thuringiensis en el Control Integrado de Plagas.* P. Caballero y J. Ferré [ed]. M .V. Phytoma-España, S.L. España.

Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, L. Bumgarner y W. Moar. 1995. Selection and genetic analisys of a *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *J. Econ. Entomol.* 88: 1545-1559.

Gringorten, J. L., R. E. Milne, P. G. Fast, S. S. Sohi y K. Van Frankenhuyzen. 1992. Suppresion of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin activity by low alkaline pH. *J. Invertebr. Pathol.* 60: 47-52.

Guerra, A. A. y T. N. Shaver. 1968. A bioassay technique for screening feeding stimulants for larvae of tobacco budworm. *J. Econ Entomol.* 61:1398-1399.

Höfte, H., J. Van Rie, S. Jansens, A. Van Houtven, H. Vanderbruggen y M. Vaeck. 1988. Monoclonal antibody analysis and insecticidal spectrum of three types of lepidopteran-specific insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2010-2017.

Höfte, H. y H. R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol Rev.* 53: 242-255.

Honée, G., W. Vriezen y B. Visser. 1990. A translation fusion product of two different insecticidal crystal protein genes of *Bacillus thuringiensis* exhibits and enlarged insecticidal spectrum. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 823-825.

Huang, F., L. L. Bushman y R. A. Higgins. 1999. Susceptibility of different instars of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to diet containing *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 92: 547-550.

Ignoffo, C. M. y O. F. Batzer. 1971. Microencapsulation and ultraviolet protectants to increase sunlight stability of an insect virus. J. Econ. Entomol. 64: 850-853.

Ignoffo, C. M. y C. García. 1978. UV-photoactivation of cells and spores of *Bacillus thuringiensis* and effects of peroxidase on inactivation. Environ. Entomol. 7: 270-272.

Ignoffo, C. M., C. García y G. Saathoff. 1997. Sunlight stability and rain-fastness of formulations of *Baculovirus heliothis*. Environ. Entomol. 26: 1470-1474.

Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter, P. P. Sikorowski, G. Sutter y W. M. Brooks. 1977. Inactivation of representative species of entomopathogenic viruses, a bacterium, fungus and protozoan by an ultraviolet light source. Environ. Entomol. 6: 411-415.

Ignoffo, C. M., D. L. Hostetter y D. B. Smith. 1976. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: Three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. J. Econ. Entomol. 69: 207-210.

Inagaki, S., M. Miyasono, T. Ishiguro, R. Takeda y Y. Hayashi. 1992. Proteolytic processing of δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 in insensitive insect, *Spodoptera litura*: Unusual proteolysis in the presence of sodium dodecyl sulfate. J. Invertebr. Pathol. 60: 64-68.

Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. 1991. VII Censo agrícola-ganadero. pp. 40-43.

Inglis, G. D., A. M. Lawrence y F. M. Davis. 2000. Pathogens associated with southwestern corn borers and southern corn stalk borers (Lepidoptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. 93: 1619-1626.

Iracheta-Cárdenas, M. M. 1999. Toxicidad de la clase Cry1 de *Bacillus thuringiensis* y su unión a receptores en *Trichoplusia ni*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.

Iriarte, J. y P. Caballero. 2001. Biología y ecología de *Bacillus thuringiensis*. pp. 15-44 En Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. P. Caballero y J. Ferré [ed]. M.V. Phytoma-España, S.L. España.

Itoua-Apoyolo, C., L. Drif, J. M. Vassal, H. DeBarjac, J. P. Bossy, F. Leclant y R. Frutos. 1995. Isolation of multiple subspecies of *Bacillus thuringiensis* from a population of the European sunflower moth *Homoeosoma nebulella*. Appl. Environ. Microbiol. 61: 4343-4347.

Jansson, R. K., R. F. Peterson, W. R. Halliday, P. K. Mookerjee y R. A. Dybas. 1996. Efficacy of solid formulations of emamectin benzoate at controlling lepidopterous pests. *Florida Entomologist*. 79: 434-449.

Jarret, P. y M. Stephenson. 1990. Plasmid transfer between strains of *Bacillus thuringiensis* infecting *Galleria mellonella* and *Spodoptera littoralis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1608-1614.

Johnson, K. J. R. 1984. Identification of *Eureuma loftini* (Dyar) (Lepidoptera: Pyralidae) in Texas, 1980: Forerunner for other sugarcane boring pest immigrants from Mexico?. *Bulletin of the ESA*. 47-52.

Johnson, D. R. 1982. Supression of *Heliothis* spp. on cotton by using *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus heliothis*, and two feeding adjuvants. *J. Econ. Entomol.* 75: 207-210.

Juárez-Pérez, V. M., M. D. Ferrandis y R. Frutos. 1997. PCR-Based approach for detection of novel *Bacillus thuringiensis* cry genes. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2997-3002.

Jyoti, J. L. y G. J. Brewer. 1999. Median lethal concentration and efficacy of *Bacillus thuringiensis* against banded sunflower moth (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 92: 1289-1291.

Kalman, S., K. L. Kiehne, N. Cooper, M. S. Reynoso y T. Yamamoto. 1995. Enhanced production of insecticidal crystal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3063-3068.

Kalman, S., K. L. Kiehne, J. L. Libs y T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel cryIC-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1131-1137.

Karamanlidou, G., A. F. Lambropoulos, S. I. Kolias, T. Manousis, D. Ellar y C. Kastritis. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2277-2282.

Kasman, L. M., A. A. Lukowiak, S. F. Garczynski, R. J. McNall, P. Youngman y M. J. Adang. 1998. Phage display of a biologically active *Bacillus thuringiensis* toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2995-3003.

Keeton, T. P., B. R. Francis, W. S. A. Maaty y L. A. Bulla, Jr. 1998. Effects of midgut-protein-preparative and ligand binding procedures on the toxin binding characteristics of BT-R₁, a common high-affinity receptor in *Manduca sexta* for Cry1A *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 2158-2165.

Keller, J. C., F. G. Maxwell y J. N. Jenkins. 1962. Cotton extracts as arrestants and feeding stimulants for the boll weevil. *J. Econ. Entomol.* 55: 800-801.

Kennedy, G.G. y M.E. Whalon. 1995. Managing pest resistance to *Bacillus thuringiensis* endotoxins: Constraints and incentives to implementation. *J. Econ. Entomol.* 88: 454-460.

Kinsinger, R.A. y W. M. H. McGaughey. 1979. Susceptibility of populations of indianmeal moth and almond moth to *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 72: 346-349.

Koziel, M. G., N. B. Carozzi, T. C. Currier, G. W. Warren y S. V. Evola. 1993. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future uses. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*. 11: 171-228.

Kuo, W.-S. y K.-G. Chak. 1996. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1369-1377

Lacey, L.A., M.S. Mulla y H.T. Dulmage. 1978. Some factors affecting the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* Berliner against blackflies. *Environ. Entomol.* 7: 583-588.

Lambert, B., L. Buysse, C. Decock, S. Jansens, C. Piens, B. Saey, J. Seurinck, K. Van Audenhove, J. Van Rie, A. Van Vliet y M. Peferoen. 1996. A *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80-86.

Lambert, B., H. Höfte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2536-2542.

Lampel, J. S., G. L. Canter, M. B. Dimock, J. F. Kelly, J. J. Anderson, B. B. Uratani, J. S. Foulke, Jr. y J. T. Turner. 1994. Integrative cloning, expression and stability of the *cryIAc* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 501-508.

Lecadet, M. M., J. Chaufaux, J. Ribier y D. Lereclus. 1992. Construction of novel *Bacillus thuringiensis* strains with different insecticidal activities by transduction and transformation. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 840-849.

Lee, M. K., A. Curtiss, E. Alcantara y D. H. Dean. 1995. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins Cry1Aa and Cry1Ac on the gipsy moth *Lymantria dispar*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 583-586 (a).

Lee, M. K., F. Rajamohan, F. Gould y D. H. Dean. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A δ-endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3836-3842 (b).

Lee, M. K., T. H. You, B. A. Young, J. A. Cotrill, A. P. Valaitis y D. H. Dean. 1996. Aminopeptidase N purified from gipsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2845-2849.

Legaspi, J. C., R. R. Saldaña y N. Rozeff. 1984. Identifying and managing stalkborers on Texas sugarcane. *Bulletin of the Entomological Society of America*. 30: 3.

Legaspi, J. C., B. C. Legaspi, Jr., I. Lauzière, J. W. Smith, Jr., L. A. Rodríguez-del-Bosque, W. A. Jones y R. R. Saldaña. 2000. Incidence of mexican rice borer (Lepidoptera: Pyralidae) and Jalisco fly parasite (Diptera: Tachinidae) in Mexico. *Southwestern Entomologist*. 25: 21-30.

Leibee, G. L., R. K. Jansson, G. Nuessly y J. L. Taylor. 1995. Efficacy of emamectin benzoate and *Bacillus thuringiensis* at controlling diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) populations on cabbage in Florida. *Florida Entomologist*. 78: 82-96.

Leong, K. L. H., R. J. Cano y A. M. Kubinski. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. *Environ. Entomol.* 9: 593-599.

Li, S. Y., S. M. Fitzpatrick y M. B. Isman. 1995. Susceptibility of different instars of the obliquebanded leafroller (Lepidoptera: Tortricidae) to *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*. *J. Econ. Entomol.* 88: 610-614.

Liu, Y.-B., B. E. Tabashnik y M. W. Johnson. 1995. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 88: 788-792.

Liu, Y.-B., B. E. Tabashnik, L. Masson, B. Escriche, and J. Ferré. 2000. Binding and toxicity of *Bacillus thuringiensis* protein CryIC to susceptible and resistant diamondback moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 1-6.

Liu, Y.-B., B. E. Tabashnik, W. J. Moar y R. A. Smith. 1998. Synergism between *Bacillus thuringiensis* spores and toxins against resistant and susceptible diamondback moths (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1385-1389.

López-Meza, J. E. Y J. E. Ibarra. 1996. Characterization of a novel strain of *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1306-1310.

Lord, J. C. y A. H. Undeen. 1990. Inhibition of the *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxin by dissolved tannins. *Environ. Entomol.* 19: 1547-1551.

Lorenz, A., A. Darszon, C. Díaz, A. Liévano, R. Quintero y A. Bravo. 1995. δ-endotoxins induce cation channels in *Spodoptera frugiperda* brush border membranes in suspensión and in planar lipid bilayers. *FEBS Letters*. 360: 217-222.

Lu, H., F. Rajamohan y D. H. Dean. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. *J. Bacteriol.* 176: 5554-5559.

Luna Santillana, E. J. 1998. Formulaciones asperjables de *Bacillus thuringiensis* a base de pectina y gelatina, y evaluación tóxica contra *T. ni*. Tesis de Licenciatura, Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas. U.A.N.L. Monterrey, N.L. México.

Luttrell, R. G., W. C. Yearian y S. Y. Young. 1983. Effect of spray adjuvants on *Heliothis zea* (Lepidoptera: Noctuidae) nuclear polyhedrosis virus efficacy. J. Econ. Entomol. 76: 162-167.

Manoj Kumar, A. S. y A. I. Aronson. 1999. Analysis of mutations in the pore-forming region essential for insecticidal activity of a *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin. J. Bacteriol. 181: 6103-6107.

Marçon, P. C. R. G., L. J. Young, K. L. Steffey y B. D. Siegfried. 1999. Baseline susceptibility of European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Econ. Entomol. 92: 279-285.

Martens, J. W. M., G. Honée, D. Zuidema, J. W. M. Van Lent, B. Visser y J. M. Vlak. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2764-2770.

Masson, L., M. Erlandson, M. Puzstai-Carey, R. Brousseau, V. Juárez-Pérez y R. Frutos. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 64: 4782-4788.

Maxwell, F. G., J. N. Jenkins, J. C. Keller y W. L. Parrot. 1963. An arrestant and feeding stimulant for the boll weevil in water extracts of cotton-plant parts. J. Econ. Entomol. 56: 449-454.

McGuire, M. R y B. S. Shasha. 1992. Adherent starch granules for encapsulation of insect control agents. J. Econ. Entomol. 85: 1425-1433.

McGuire, M. R. y B. S. Shasha. 1995. Starch encapsulation of microbial pesticides. pp. 229-237. En Biorational Pest Control Agents: Formulation and Delivery. F. R. Hall and J. W. Barry [ed]. American Chemical Society. Washington, D.C.

McGuire, M. R., B. S. Shasha, C. E. Eastman y H. Oloumi-Sadeghi. 1996. Starch- and flour-based sprayable formulations: Effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 89: 863-869.

McGuire, M. R., B. S. Shasha, L. C. Lewis, R. J. Bartelt y K. Kinney. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 83: 2207-2210.

McGuire. M. R., B. S. Shasha, L. C. Lewis y T. C. Nelsen. 1994. Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 87: 631-637.

McGuire, M. R. y B. S. Shasha. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 83: 1813-1817.

McMillian, W. W., J. R. Young, B. R. Wiseman y A. N. Sparks. 1968. Arrestant-feeding stimulant as an additive to shell SD-8447 for control of corn earworm larvae in sweet corn. J. Econ. Entomol. 61: 642-644.

Meagher, Jr., R. L., J. W. Smith, Jr., H. W. Browning y R. R. Saldaña. 1998. Sugarcane stemborers and their parasites in southern Texas. Environ. Entomol. 27: 759-766.

Melton, C. W., H. W. Browning, J. W. Smith y C. W. Agnew. 1986. A search in western Mexico for natural enemies of the mexican rice borer, *Eoreuma loftini* (Dyar), September, 1984. Texas Agric. Exp. Sta. Prog. Rep. PR-4355. 8 pp.

Mertz, B. P., S. J. Fleischer, D. D. Calvin y R. L. Ridgway. 1995. Field assessment of *Trichogramma brassicae* (Hymenoptera: Trichogrammatidae) and *Bacillus thuringiensis* for control of *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in sweet corn. J. Econ. Entomol. 88: 1616-1625.

Mettus, A.-M. y A. Macaluso. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin genes during vegetative growth. Appl. Environ. Microbiol. 56: 1128-1134.

Miyasono, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda y Y. Hayashi. 1994. Enhancement of δ-endotoxin activity by toxin-free spore of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. J. Invertebr. Pathol. 63: 111-112.

Moar, W. J., L. Masson, R. Brousseau y J. Trumble. 1990. Toxicity to *Spodoptera exigua* and *Trichoplusia ni* of individual Pi protoxins and sporulated cultures of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and NRD-12. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2480-2483.

Moar, W. J., M. Puszta-Carey y T. P. Mack. 1995. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. 88: 606-609.

Moar, W. J., M. Puszta-Carey, H. Van Faassen, D. Bosch, R. Frutos, C. Rang, K. Luo y M.J. Adang. 1995. Development of *Bacillus thuringiensis* CryIC resistance by *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae). Appl. Environ. Microbiol. 61: 2086-2092.

Moar, W. J., J. T. Trumble, R. H. Hice y P. A. Backman. 1994. Insecticidal activity of a CryIIA protein form NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* an in a leaf-colonizing strain of *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 896-902.

Morales Ramos, L. H., M. R. McGuire y L. J. Galán Wong. 1998. Utilization of several biopolymers of granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 91: 1109-1113.

Morales-Ramos, L. H., M. R. McGuire, L. J. Galán-Wong y R. Castro-Franco. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. Southwestern Entomologist. 25: 59-67.

Morris, O. N., M. Trottier, N. B. McLaughlin y V. Converse. 1994. Interaction of caffeine and related compounds with *Bacillus thuringiensis* spp. *kurstaki* in bertha armyworm (Lepidoptera:Noctuidae). J. Econ Entomol. 87: 610-617.

Nishiitsutsuji-Uwo, J., A. Ohsawa y M. S. Nishimura. 1977. Factors affecting the insecticidal activity of δ-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 29: 162-169.

Ogiwara, K., L. S. Indrasith, S. Asano y H. Hori. 1992. Processing of δ-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. J. Invertebr. Pathol. 60: 121-126.

Parenti, P., M. Villa, G.M. Hanozet, M. Tasca y B. Giordana. 1995. Interaction of the insecticidal crystal protein CryIA from *Bacillus thuringiensis* with aminoacid transport into brush border membranes from *Bombyx mori* larval midgut. J. Invertebr. Pathol. 65: 35-42.

Pérez-Labour, C. 1981. Manual del Cultivo de la Caña de Azúcar. Consejo Estatal del Azúcar. Santo Domingo, República Dominicana. pp. 88-105.

Pingel, R. L. y L. C. Lewis. 1999. Effect of *Bacillus thuringiensis*, *Anagrapha falcifera* multiple nucleopolyhedrovirus, and their mixture on three lepidopteran corn ear pests. J. Econ. Entomol. 92: 96-91.

Pocar, M. y P. Caballero. 2001. Diversidad genética de *Bacillus thuringiensis*, pp 45-69. En. Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. P. Caballero y J. Ferré [ed]. M .V. Phytoma-España, S.L. España.

Quintero Ramírez, R. 1997. Análisis Técnico-Económico Sobre la Producción de *Bacillus thuringiensis*. CamBioTec. pp 27 -82.

Quintero-Ramírez, R. 2001. Temas relacionados con transferencia de tecnología: Prospectiva tecnológica y áreas de oportunidad en México (II). Universidad Autónoma de Nuevo León y Centro de Transferencia de Tecnología.

Rajamohan, F., E. Alcantara, M. K. Lee, X. J. Chen, A. Curtiss y D. H. Dean. 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* CryIAb δ-endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. J. Bacteriol. 177: 2276-2282.

Reed, J. P. y W. R. Halliday. 2001. Establishment of Cry9C susceptibility baselines for European corn borer and southwestern corn borer (Lepidoptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. 94: 397-402.

- Rhodes, D. 1993. Formulation of biological control agents. En Exploitation of Microorganisms. D. G. Jones [ed] Chapman and Hall. London.
- Ridgway, R. L., V. L. Illum, R. R. Farrar, Jr., D. D. Calvin, S. J. Fleischer, y M. N. Inscoe. 1996. Granular matrix formulation of *Bacillus thuringiensis* for control of the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae). J. Econ Entomol. 89: 1088-1094.
- Rossiter, M., W. G. Yendol y N.R. Dubois. 1990. Resistance of *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae): Genetic and environmental causes. J. Econ. Entomol. 83: 2211-22218.
- Sánchez, M., T. E. Méndez y O. Almazán. 1992. Obtención de un biopreparado en polvo del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill. (Deuteromycotina: Hyphomycetes). Rev. Lat-amer. Microbiol. 34: 319-323.
- Santiago-Alvarez, C. y E. Quesada-Moraga. 2001. Empleo de *Bacillus thuringiensis* en los sistemas agrícolas, pp. 189-215. En. Bioinsecticidas: Fundamentos y Aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* en el Control Integrado de Plagas. P. Caballero y J. Ferré [ed]. M .V. Phytoma-España, S.L. España.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775-806.
- Shang, W.-S. y K.-F. Chak. 1996. Identification of novel cry-type genes from *Bacillus thuringiensis* strains on the basis of restriction fragment length polymorphism of the PCR-amplified DNA. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1369-1377.
- Shapiro, M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectan for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. 82: 548-550.
- Shapiro, M. y J. L. Robertson. 1992. Enhancement of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) *Baculovirus* activity by optical brighteners. J. Econ. Entomol. 85: 1120-1124.
- Shapiro, J. P., W. J. Schroeder y P. A. Stansly. 1998. Bioassay and efficacy of *Bacillus thuringiensis* and an organosilicone surfactant against the citrus leafminner (Lepidoptera: Phyllocnistidae). 81: 201-210.
- Shorey, H. H. 1963. A simple artificial rearing medium for the cabbage looper. J. Econ. Entomol. 56: 536-537.
- Siegfried, B. D., T. Spencer y J. Nearman. 2000. Baseline susceptibility of the corn earworm (Lepidoptera: Noctuidae) to the Cry1Ab toxin from *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 93: 1265-1268.

Smith R. A. y G. A. Couche. 1991. The phylloplane as a source of *Bacillus thuringiensis* variants. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 311-315.

Smith D. B., D. L. Hostetter, R. E. Pinnell y C. M. Ignoffo. 1982. Laboratory studies of viral adjuvants: Formulation development. *J. Econ. Entomol.* 75: 16-20.

Tabashnik, B. E. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3343-3346.

Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79 (a).

Tabashnik, B. E., N. Finson y M. W. Johnson. 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis* lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *J. Econ. Entomol.* 84: 49-55.

Tabashnik, B. E., N. Finson , M. W. Johnson y D. G. Heckel. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback moth (*Plutella xylostella*). *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4627-4629 (b).

Tabashnik, B. E., N. Finson , M. W. Johnson y W. J. Moar. 1993. Resistance to toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* causes minimal cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *aizawai* in the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1332-1335.

Tamez-Guerra, P., R. Castro- Franco, H. Medrano-Roldán, M. R. McGuire, L. J. Galán-Wong y H. A. Luna-Olvera. 1998. Laboratory and field comparisons of strains of *Bacillus thuringiensis* for activity against noctuid larvae using granular formulations (Lepidoptera). *J. Econ. Entomol.* 91: 86-93.

Tamez-Guerra, P. M. R. McGuire, R. W. Behle, J. J. Hamm, H. R. Sumner y B. S. Shasha. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of baculovirus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 93: 210-218. (a)

Tamez-Guerra, P. M. R. McGuire, R. W. Behle, B. S. Shasha y L. J. Galán-Wong. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 93: 219-225. (b).

Tamez-Guerra, P., M. R. McGuire, H. Medrano- Roldán, L. J. Galán-Wong, B. S. Shasha y F. E. Vega. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* 89: 1424-1430.

Tamez-Guerra, P., C. García-Gutiérrez, H. Medrano-Roldán, L. J. Galán-Wong y C. F. Sandoval-Coronado. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. *Southwestern Entomologist.* 24: 37-48.

Thomas, D. J. I., J. A. W. Morgan, J. M. Whippy y J. R. Saunders. 2000. Plasmid transfer between the *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* in laboratory culture and soil and in lepidopteran and coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 118-124.

Van Frankenhuyzen, K., J. L. Gringorten, D. Gauthier, R. E. Milne, L. Mason y M. Peferoen. 1993. Toxicity of activated CryI proteins from *Bacillus thuringiensis* to six forest lepidoptera and *Bombyx mori*. *J. Invertebr. Pathol.* 62: 295-301.

Van Frankenhuyzen, K., R. Milne, R. Brousseau y L. Mason. 1992. Comparative toxicity of the HD-1 and NRD-12 strains of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* to defoliating forest lepidoptera. *J. Invertebr. Pathol.* 59: 149-154.

Van Frankenhuyzen K. y C. Nystrom. 1989. Residual toxicity of a high-potency formulation of *Bacillus thuringiensis* to spruce budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *J. Econ. Entomol.* 82: 868-872.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1989. Specificity of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxins. Importance of specific receptor on the brush border membrane of the midgut of target insects. *FEBS.* 239-247.

Van Rie, J., S. Jansens, H. Höfte, D. Degheele y H. Van Mellaert. 1990. Receptors on the brush border membrane of the insect midgut as determinants of the specificity of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Appl. Environ. Entomol.* 56: 1378-1385.

Venette, R. C., W. D. Hutchison y D. A. Andow. 2000. An in-field screen for early detection and monitoring of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* in transgenic crops. *J. Econ. Entomol.* 93: 1055-1064.

Von Tersch, M. A., H. L. Robbins, C. S. Jany y T. B. Johnson. 1991. Insecticidal toxins from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kenyae*: Gene, cloning and characterization and comparison with *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* CryIAC toxins. *57:* 349-358.

Weissling, T. J. y L. J. Meinke. 1991. Potential of starch encapsulated semiochemical-insecticide formulations for adult corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) control. *J. Econ. Entomol.* 84: 601-609.

Wiedenmann, R. N. y J. W. Smith, Jr. 1993. Functional response of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) at low densities of the host *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol.* 22: 849-858.

Wiedenmann R. N. y J. W. Smith, Jr. 1995. Parasitization of *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera:Pyralidae) by *Cotesia chilonis* and *C. flavipes* (Hymenoptera:Braconidae). *Environ. Entomol.* 24: 950-961.

Widenmann, R. N., J. W. Smith, Jr. y P. O. Darnell. 1992. Laboratory rearing and biology of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymeoptera: Braconidae) using *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) as a host. Environ. Entomol. 21: 1160-1167.

Wolfersberger, M G., X. J. Chen y D. H. Dean. 1996. Site-directed mutations in the third domain of *Bacillus thuringiensis* δ-endotoxin CryIAa affect its ability to increase the permeability of *Bombyx mori* midgut brush border membrane vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 62: 279-282.

Yamamoto, T. y T. Iizuka. 1983. Two types of entomocidal toxins in the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis kurstaki*. Archives of Biochemistry and Biophysics. 227: 233-241.

Yendol, W. G., R. A. Hamlen y S. B. Rosario. 1975. Feeding behavior of gypsy moth larvae on *Bacillus thuringiensis*-treated foliage. J. Econ. Entomol. 68: 25-27.

Zehnder, G. W. y W. D. Gelernter. 1989. Activity of M-ONE formulation of a new strain of *Bacillus thuringiensis* against the colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae): relationship between susceptibility and insect life stage. J. Econ. Entomol. 82: 756-761.

Zehnder, G. W., G. M. Ghidiu y J. Speese III. 1992. Use of the occurrence of peak colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) egg hatch for timing of *Bacillus thuringiensis* spray applications in potatoes. J. Econ. Entomol. 85: 281-288.

Zelazny, B., D. Stephan y J. Hamacher. 1994. Irregular crystal formation in some isolates of *Bacillus thuringiensis*. J. Invertebr. Pathol. 63: 229-234.

Zhang, M.-Y., A. Lövgren y R. Landén. 1995. Adhesión and cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* to cultured *Spodoptera* and *Drosophila* cells. J. Invertebr. Pathol. 66: 46-51.



