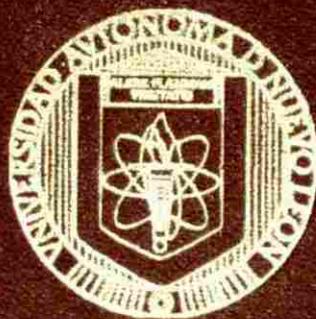


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



ELABORACION DE FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* Y DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD TOXICA CONTRA LARVAS DE *Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) EN LABORATORIO Y CAMPO.

TESIS QUE PRESENTA LA

M.C. NINFA MARIA ROSAS GARCIA

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD

EN BIOTECNOLOGIA

Monterrey, N. L., México

Enero, 2002

TD
SB975
.R6
2002
c.1

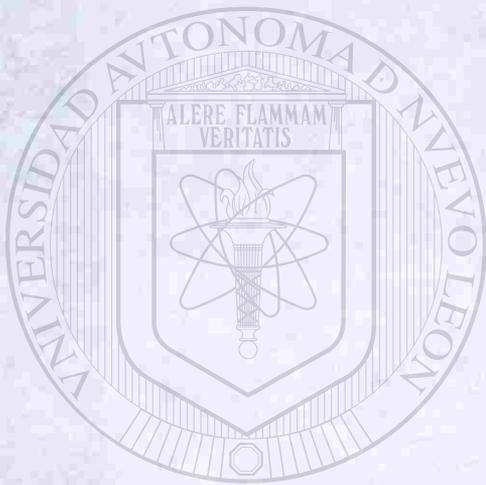
2002

ELABORACION DE FORMULADOS DE Bacillus
thuringiensis CONTRA Diabrotica saccharalis

N.M.R.C.



1080124485



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

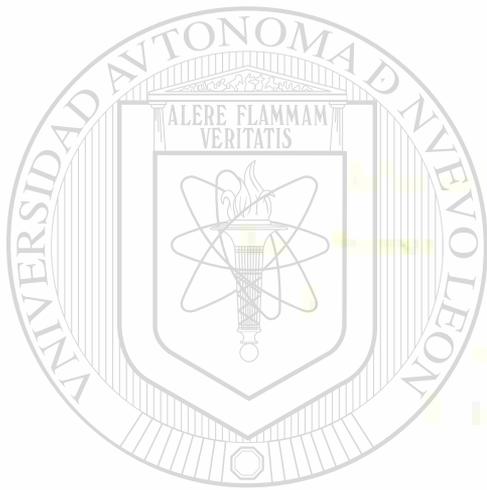
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOTECNICAS

DIVISION DE POSGRADOS DE POSTGRADO



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD

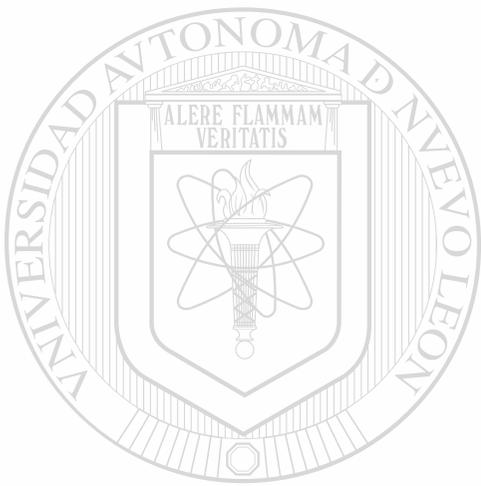
EN BIOTECNOLOGIA

San Nicolás de los Garza, N. L., México

Septiembre 2012



TD
SB975
• R6
2002



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

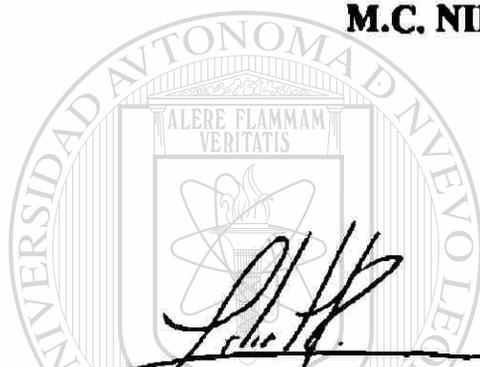
ELABORACIÓN DE FORMULADOS DE *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*
Y DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD TÓXICA CONTRA LARVAS DE
***Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: Pyralidae)**
EN LABORATORIO Y CAMPO.

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL GRADO
ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
BIOTECNOLOGÍA POR

M.C. NINFA MARÍA ROSAS GARCÍA

APROBADA:
COMISIÓN DE TESIS



DRA. LILIA H. MORALES RAMOS
DIRECTOR
PRESIDENTE

DRA. KATIUSHKA AREVALO NIÑO
SECRETARIO

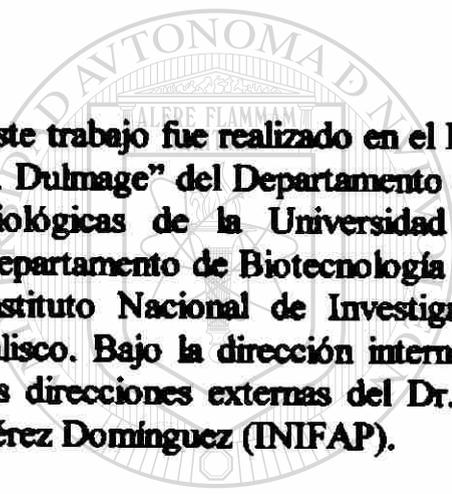
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DR. LUIS J. GALÁN WONG
VOCAL

DR. BENITO PEREYRA ALFÉREZ
VOCAL

DR. HIRAM MEDRANO ROLDÁN
DIRECTOR EXTERNO
VOCAL

DR. JUAN FRANCISCO PÉREZ D.
DIRECTOR EXTERNO
PROFESOR INVITADO



Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo “Dr. H. T. Dulmage” del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en colaboración con el Departamento de Biotecnología del Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Dgo., y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias del centro de Jalisco. Bajo la dirección interna de la Dra. Lilia H. Morales Ramos (F.C.B./U.A.N.L.) y las direcciones externas del Dr. Hiram Medrano Roldán (I:T:D) y el Dr. Juan Francisco Pérez Domínguez (INIFAP).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

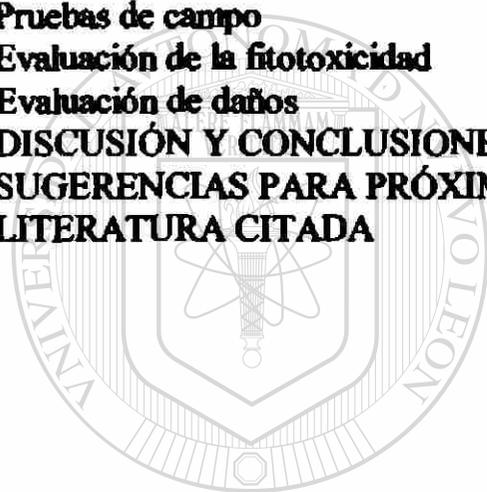


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
IMPORTANCIA	5
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN	6
HIPÓTESIS	6
OBJETIVO PRINCIPAL	6
OBJETIVOS PARTICULARES	6
ANTECEDENTES	8
Modo de acción de las toxinas de <i>B. thuringiensis</i>	9
Estructura de la toxina	13
Toxicidad de <i>B. thuringiensis</i>	14
Genética de <i>B. thuringiensis</i>	17
Sistemas de intercambio genético	20
Resistencia	21
Formulaciones	24
Caña de azúcar	37
Descripción botánica	37
<i>Diatraea saccharalis</i>	38
MATERIALES Y MÉTODOS	44
Implementación de la cría de <i>D. saccharalis</i>	44
Obtención del complejo espora-cristal	44
Bioensayos de toxicidad contra larvas de <i>D. saccharalis</i>	45
Detección de genes <i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> y <i>cry1C</i> de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> mediante análisis de PCR e inmunodetección de proteínas Cry	46
Determinación de CL ₅₀ y TL ₅₀	47 [®]
Propagación de la cepa efectiva y obtención del extracto a nivel de fermentador	48
Elaboración de formulados granulares para bioensayos de preferencia alimenticia	48
Bioensayos de preferencia alimenticia	49
Elaboración de los formulados granulares y asperjables a base de <i>B. thuringiensis</i> para bioensayos de laboratorio	49
Determinación de la actividad tóxica de las formulaciones contra <i>D. saccharalis</i> a nivel de laboratorio	50
Microscopía electrónica de barrido	50
Pruebas de campo	51
Muestreo para la selección del área del experimento	51
Momento de la aplicación	51
Muestreo y tamaño de muestra	52
Evaluación de la fitotoxicidad al cultivo	52
Evaluación de las poblaciones de barrenadores	52

Evaluación del daño ocasionado por los barrenadores	53
Registro de la fenología de la planta	53
Análisis estadístico	53
RESULTADOS	66
Establecimiento de la cría masiva de <i>D. saccharalis</i>	66
Bioensayos de toxicidad contra <i>D. saccharalis</i>	66
Detección de genes <i>cry1Aa</i> , <i>cry1Ab</i> , <i>cry1Ac</i> , <i>cry1B</i> y <i>cry1C</i> de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> mediante análisis de PCR e inmunodetección de proteínas Cry	67
Determinación de la concentración letal media y tiempo letal medio	67
Bioensayos de preferencia alimenticia	67
Determinación de la actividad tóxica de los formulados contra <i>D. saccharalis</i> a nivel de laboratorio	68
Microscopía electrónica de barrido	68
Pruebas de campo	68
Evaluación de la fitotoxicidad	69
Evaluación de daños	69
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	96
SUGERENCIAS PARA PRÓXIMAS INVESTIGACIONES	102
LITERATURA CITADA	103



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Página
1	Localización geográfica de diversas especies de <i>Diatraea</i> en México y el Valle de Texas en área de producción cañera.	41
2	Proceso de cría artificial masiva de <i>Diatraea saccharalis</i>	54
3	Proceso de cría artificial masiva de <i>Diatraea saccharalis</i>	55
4	Elaboración de formulados granulares	56
5	Cajas petri mostrando la colocación de los gránulos para la realización de los bioensayos de preferencia alimenticia	58
6	Aplicación del bioinsecticida en forma asperjable y granular en cultivo de caña de azúcar	61
7	Croquis elaborado para realizar las pruebas de campo	62
8	Muestreo de tallos para observar daño externo causado por barrenadores y cortes longitudinales para evaluación de daño	64
9	Ciclo biológico de <i>Diatraea saccharalis</i>	71
10	Bioensayo de mortalidad de las 12 cepas de <i>B. thuringiensis</i> contra larvas de dos días de edad de <i>D. saccharalis</i>	73 [®]
11	Larvas obtenidas después de la realización de los bioensayos	74
12	Detección de los genes <i>cry1Aa</i> y <i>cry1Ab</i> en diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas contra <i>D. saccharalis</i>	76
13	Detección del gen <i>cry1Ac</i> en diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas contra <i>D. saccharalis</i>	77
14	Detección de genes <i>cry1B</i> y <i>cry1C</i> en diferentes cepas de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas contra <i>D. saccharalis</i>	78
15	Perfil de proteínas e inmunodetección de la mezcla espora-cristal de las cepas tóxicas a <i>D. saccharalis</i>	79

16	Mortalidad causada a <i>D. saccharalis</i> por formulados granulares a base de la cepa GM34 de <i>B. thuringiensis</i> en bioensayos de laboratorio	83
17	Mortalidad causada a <i>D. saccharalis</i> por formulados asperjables a base de la cepa GM34 de <i>B. thuringiensis</i> en bioensayos de laboratorio	84
18	Fotografías al microscopio electrónico de barrido	85
19	Esporas y cristales de las cepas que resultaron tóxicas a <i>D. saccharalis</i> observadas al microscopio electrónico de barrido	86
20	Presencia de <i>D. saccharalis</i> y muestra de daños causados en el cultivo de caña de azúcar seleccionado para las pruebas de campo	94
21	Cultivo de caña de azúcar y su procesamiento	95



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



INDICE DE TABLAS

Tabla	Título	Página
1	Productos comerciales de cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i>	25
2	Productos recombinantes comerciales de <i>B. thuringiensis</i>	29
3	Productos comerciales recombinantes de <i>B. thuringiensis</i> en <i>Pseudomonas</i>	30
4	Datos obtenidos de la industria azucarera en México en 1998	39
5	Tipos de soportes obtenidos de las combinaciones de los polímeros y fagoestimulantes	57
6	Cantidad de ingredientes utilizados para la elaboración de los formulados asperjables	59
7	Orden de los tratamientos aplicados	60
8	Escala de puntuación propuesta por la European Weed Research Society para determinar el grado de fitotoxicidad	63
9	Contrastes ortogonales en la comparación de tratamientos y grupos de tratamientos	65
10	Bioensayo de mortalidad de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>D. saccharalis</i> utilizando dosis alta y baja del complejo espóra-cristal	72
11	Presencia de genes <i>cryIA</i>, B y C en las cepas de <i>B. thuringiensis</i> tóxicas contra <i>D. saccharalis</i>	75
12	Determinación de la CL_{50} para cepas de <i>B. thuringiensis</i> que resultaron tóxicas contra <i>D. saccharalis</i>	80
13	Análisis de varianza obtenido de la comparación de los polímeros usando diferentes fagoestimulantes	81
14	Comparación de media por la prueba de Tukey para todos los soportes	82

15	Comparación de medias por la prueba de Tukey para el tamaño de los cristales producidos por las 5 cepas tóxicas de <i>B. t.</i> a <i>D. saccharalis</i>	87
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. 2001-12-20	88
17	Promedio de cepas dañadas por tratamiento	89
18	Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por barrenadores el día de la aplicación. La Escalera, Ameca, Jal. 2001	90
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	91
20	Análisis de varianza de contrastes con relación al muestreo de daño por barrenadores 38 días después de la aplicación. La Escalera, Ameca, Jal. 2001	92
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	93

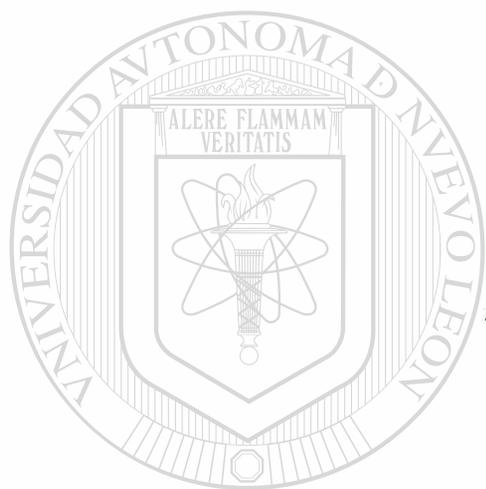
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DEDICATORIA

**A mi esposo
Martín Alberto**



**A mis hijos
Fernanda Cecilia
y
Alejandro Alberto**

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Feliz el hombre que se dedica a la sabiduría y se hace preguntas hasta que tenga respuestas, que interioriza los caminos de la sabiduría y reflexiona en sus secretos, que la persigue como el cazador, acecha sus pasos, atisba por sus ventanas y escucha en sus puertas, acampa junto a su casa y fija sus estacadas junto a sus murallas.

(Sir 14, 20-24)

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi profundo agradecimiento:

A la Dra. Lilia Hortencia Morales Ramos por su magnífica dirección en el desarrollo de este trabajo, por permitirme participar en su línea de investigación durante los 5 años de mis estudios de postgrado, así como también por todos sus valiosos comentarios, sugerencias y apoyo tanto en el sentido académico como en el personal.

A la Dra. Katuska Arévalo Niño por sus excelentes comentarios en la revisión de este trabajo, por los consejos brindados y por todas las facilidades proporcionadas durante todo este tiempo.

Al Dr. Luis J. Galán Wong por las observaciones realizadas a este trabajo, su invaluable apoyo y facilidades otorgadas.

Al Dr. Benito Pereyra Alférez por su excelente supervisión en las pruebas de biología molecular, así como por todos sus consejos y acertados comentarios.

Al Dr. Hiram Medrano Roldán por la revisión a este trabajo así como por su valiosa colaboración al facilitarnos las instalaciones de la Unidad de Planta Piloto del ITD para la elaboración de los formulados.

Al Dr. Juan Francisco Pérez Domínguez por su excelente dirección y supervisión en las pruebas de campo, así como por todas las facilidades otorgadas en el INIFAP del centro de Jalisco.

A la Dra. Julia Verde Star, Subdirectora de Postgrado de esta Facultad, por todas las facilidades y apoyo brindados.

Al M.C. Jorge L. Hernández Piñero por su valioso apoyo fotográfico y todas las facilidades brindadas en la Unidad de Microscopía Electrónica de esta Facultad.

Al Ing. Andrés Suárez Vez de la empresa Aranal, S.A de C.V. por proporcionar el Capsul para la realización de este trabajo.

A mis padres, Sr. Víctor Manuel Rosas Treviño y **Sra. Nínfa García Martínez** por todo su apoyo y cariño brindados para que yo pudiera llevar a cabo esta meta.

Al Sr. Feliciano Molina por su desinteresada ayuda en el establecimiento de la cría de insectos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de forjarme como una profesional con las herramientas necesarias para servir a mi país.

A todos mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo y a todas aquellas personas que de una u otra manera contribuyeron en este trabajo.

RESUMEN

El control biológico se ha utilizado desde hace varias décadas para combatir plagas de importancia económica. El uso de este recurso ha ido en aumento anteponiéndose como una alternativa a los insecticidas químicos que tanto dañan el ambiente. El microorganismo que se ha utilizado con mayor preferencia en este tipo de insecticidas es *Bacillus thuringiensis* y en este trabajo se propone como una alternativa adecuada y eficaz para el control de *Diatraea saccharalis* que es una plaga de la caña de azúcar, la cual causa daños importantes a la economía. Los objetivos planteados en este trabajo fueron la selección de cepas con actividad tóxica contra este insecto, determinar la presencia de genes *cryI* que puedan estar relacionados con la toxicidad, producir el complejo espora-cristal a nivel de fermentador de la cepa efectiva, formular este complejo con polímeros biodegradables como el almidón de maíz modificado (Capsul®) y la gelatina, agregando fagoestimulantes como el Coax®, azúcar y caña de azúcar en polvo, en forma asperjable y granular y evaluar su toxicidad en laboratorio y campo. Resultaron 5 cepas tóxicas entre las cuales no hubo diferencia significativa ($F= 1.852$, $gI= 4$, $P\leq 0.05$) en la mortalidad. La cepa seleccionada fue la GM34 var. *kurstaki* por presentar la CL_{50} más baja de 33.21 $\mu\text{g/ml}$ y a esta concentración es por lo menos 2 veces más tóxica que el resto de las cepas. El análisis de PCR reveló que esta cepa posee los genes *cryIAa*, *cryIAb* y *cryIAc*, las 4 cepas tóxicas restantes poseen tres de los genes *cryIAa*, *Ab*, *Ac*, *cryIB* y *cryIC*. Los polímeros más aceptados por las larvas de *D. saccharalis* fueron el Capsul® más la gelatina y caña de azúcar en polvo, con esta mezcla y el complejo espora-cristal se elaboraron los formulados granulares y asperjables al 3, 7 y 10%, cuya actividad tóxica a nivel de laboratorio fue superior al 80% para los granulares y cerca del 100% para los asperjables. A nivel de campo, los formulados asperjables fueron los más adecuados y mostraron una alta diferencia significativa a las 5 días después de la aplicación, también se observaron diferencias significativas entre la dosis baja del asperjable (3%) y las dosis media y alta del asperjable (7 y 10 %). Los tratamientos granulares tuvieron los niveles de daño más altos, superando incluso al testigo sin aplicación. Se apreció que las mayores cantidades de tallos con incidencia de daño ocurrieron en la etapa inicial del experimento, esto es el día de la aplicación. Se observó también que el efecto tóxico de los formulados asperjables es de 5 días en campo. El formulado asperjable a la dosis del 10% aplicado en campo es tan eficiente como un formulado comercial y altamente competitivo.

ABSTRACT

The use of biological control to protect crops of economic importance goes back several decades. Biological control offers an environmentally-friendly alternative to chemical insecticides, so its use continues to grow. *Bacillus thuringiensis* constitutes one of the most popular microorganisms in these bioinsecticides. *Diatraea saccharalis* causes great economic losses to sugar cane producers, so, in this project we propose the use of *B. thuringiensis* to control *D. saccharalis*. The goals of this project were the selection of *B. thuringiensis* strains showing toxicity against *D. saccharalis*, detection of *cry1* genes possibly relevant to toxicity, production of the spore-crystal complex of the toxic strain in fermentators, formulation of the complex with biodegradable polymers such as modified cornstarch (Capsul™) and gelatin, and evaluation of the toxicity of the formulations by means of laboratory bioassays and field tests. We included as possibilities: adding feeding stimulants such as Coax™, sugar and powdered sugar cane and formulating in either sprayable or granular form. We obtained 5 strains with very similar toxicities, given that all 5 produced statistically indistinguishable mortalities ($F= 1.852$, $df= 4$, $P\leq 0.05$). We selected GM34 var. *kurstaki* strain due to its low LC_{50} ($33.21 \mu\text{g/ml}$) resulting in a toxicity at least twice of the other strains. PCR analysis on this strain detected *cry1Aa*, *cry1Ab* and *cry1Ac* genes, while the other four strains possessed three of the following genes: *cry1Aa*, *Ab*, *Ac*, *cry1B* and *cry1C*, but not *cry1Aa*, *Ab* and *Ac* simultaneously as in GM34. *D. saccharalis* larvae showed preference for a mixture of Capsul™, gelatin and powdered sugar cane, so we used this mixture and the spore-crystal complex to elaborate granular and sprayable formulations at 3, 7 and 10% concentration. In laboratory tests, the granular formulations showed more than 80% of toxic activity, while the toxic activity of the sprayable formulations approached 100%. In the field tests, the sprayable showed a highly significant difference 5 days after spraying. We also observed significant differences between the low concentration form of the sprayable (3%) and the medium and high concentrations of the sprayable (7% and 10%). Crops treated with the granular formulation showed the highest levels of damage, even greater than the control group without any treatment. The greatest number of damaged stems appeared on the first day of treatment. We also observed that the toxic effect of the sprayable formulates lasted 5 days in the field. The sprayable formulation at 10% concentration in the field is as efficient as a commercial, highly competitive formulation.

INTRODUCCIÓN

El conocimiento de organismos capaces de generar enfermedades en los insectos se remonta a la antigüedad cuando fueron descritos por primera vez en China los efectos del hongo *Cordyceps* sobre el gusano de seda *Bombyx mori*. Desde entonces el número de enfermedades citadas ha ido en aumento, incrementándose especialmente a partir del siglo XIX, coincidiendo con el desarrollo de la microbiología. Muchos de los organismos entomopatógenos pueden ser utilizados por el hombre en el control de diversos insectos, pero el más utilizado y extendido en todo el mundo ha sido *Bacillus thuringiensis* (Iriarte y Caballero, 2001).

Desde hace algunas décadas el control biológico ha recibido una especial atención por parte de la comunidad científica, los medios de comunicación y el público en general, debido al deseo de frenar el uso de insecticidas químicos en el control de plagas, patógenos y malezas. Por este motivo todos los esfuerzos de investigación en esta área, se han incrementado substancialmente tanto en los sectores públicos como en los privados y esto se ha reflejado en el número de productos disponibles en el mercado (Rhodes, 1983).

Sin embargo, la comercialización y el uso de esta bacteria entomopatógena ha tenido ciertas limitantes, la poca persistencia en el ambiente, el no ser transmisible de unos animales susceptibles a otros y el estado de desarrollo del insecto entre algunos otros, son de las cuestiones más importantes y sobre las cuales se ha investigado abundantemente.

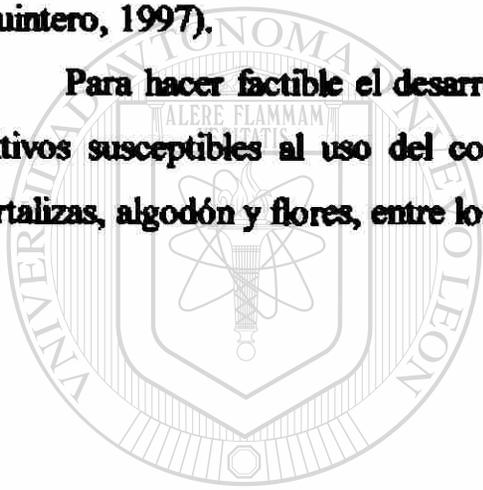
Por estos motivos, los estudios de investigación se han dirigido hacia el mejoramiento de los inconvenientes mencionados y algunos otros, mediante nuevos aislamientos con actividades insecticidas novedosas, mejoramiento de cepas ya disponibles, optimización en la producción comercial e inclusive el desarrollo de plantas transgénicas que sean capaces de contrarrestar a la plagas.

Uno de los objetivos primordiales en el control biológico de plagas, es el diseño de una formulación adecuada, cuyo papel fundamental es proveer un microambiente óptimo para el agente tóxico, proporcionando condiciones que retengan la viabilidad durante la preparación, el almacenamiento y la aplicación y favorecer la supervivencia del agente en el ambiente (Rhodes, 1983). Es por esto que la formulación de insecticidas ha recibido un especial interés, ya que de ella dependerá el éxito del uso de *Bacillus thuringiensis*.

Una de las ventajas de esta bacteria entomopatógena, es su especificidad, lo cual le permite ser utilizada, sin que exista el riesgo de dañar a otras poblaciones de insectos no blanco o benéficos y tomando ventaja de este punto tan favorable se han diseñado insecticidas dirigidos contra una determinada plaga, permitiendo que ésta sea combatida sin mayores riesgos.

En México los insecticidas a base de *B. thuringiensis* son de importación y de acuerdo a consultas realizadas con personas líderes de opinión en las actividades agrícolas, el uso de estos productos está difundido y se aplican en diversos tipos de cultivos, sin embargo su consumo no es constante ni se dispone de las mejores técnicas para aplicarlos (Quintero, 1997).

Para hacer factible el desarrollo de este mercado deben ofrecerse opciones para los cultivos susceptibles al uso del control biológico, como son el maíz, la caña de azúcar, hortalizas, algodón y flores, entre los más importantes.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

IMPORTANCIA

Los insectos pertenecientes al género *Diatraea* se han considerado plagas importantes de la caña de azúcar y del maíz, debido a que causan grandes pérdidas económicas. En México y en otros países en donde el cultivo de caña de azúcar ocupa un lugar primordial, los daños provocados por *Diatraea* sp. afectan gravemente a la industria azucarera, lo que provoca un fuerte impacto en la economía.

Sin duda alguna, la producción y el empleo de organismos para el combate de plagas ha tomado un giro muy interesante en nuestro país, ya que desde hace varios años comenzó a surgir un mayor interés en los agricultores por buscar nuevas formas de controlar a las plagas, debido a que los sistemas de control químico no han proporcionado un remedio específico. El control biológico utilizado y reportado hasta la fecha para combatir a las especies de *Diatraea* ha sido el uso de parasitoides sin embargo éstos presentan algunas serias desventajas, como la compatibilidad fisiológica entre otros muchos factores, que impiden que este tipo de control resulte exitoso en un momento determinado.

Actualmente existe muy poca información acerca del control de *D. saccharalis* mediante *B. thuringiensis* (Bohorova *et al.*, 1997), esto da lugar al diseño y utilización de un bioinsecticida a base de una cepa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica específica para *D. saccharalis*, considerándolo como una alternativa viable y factible para el control de esta plaga. Desde un punto de vista general, el desarrollo de este bioinsecticida presenta múltiples ventajas sobre los tipos de control ya utilizados, debido a que *B. thuringiensis* es altamente específico y no presenta las desventajas que implica el uso de parasitoides, por lo que la importancia de este trabajo reside en la selección y formulación de una cepa de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica contra este insecto proporcionando una alternativa de control que sea inocua al medio ambiente y al mismo tiempo eficaz.

ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACIÓN

Actualmente existen algunos reportes de la actividad tóxica de *B. thuringiensis* contra *Diatraea* sp. (Bohorova *et al.*, 1997; Aranda *et al.*, 1998; Reed y Halliday, 2001), sin embargo no hay reportes del uso de formulaciones a base de *B. thuringiensis* específicamente dirigidas para combatir esta plaga, por lo tanto la originalidad de nuestro trabajo reside en desarrollar formulados granulares y asperjables de *B. thuringiensis*, contra larvas de *D. saccharalis* a base de polímeros naturales inocuos al medio ambiente y que pueda utilizarse como una alternativa al control químico y de parasitoides.

HIPÓTESIS

Utilizando un derivado de almidón (Capsul®), así como polímeros de gelatina y/o pectina, es posible desarrollar un formulado adecuado de *B. thuringiensis*, que sea tóxico para larvas de *D. saccharalis* y factible de utilizar en campo para el control efectivo de esta plaga.

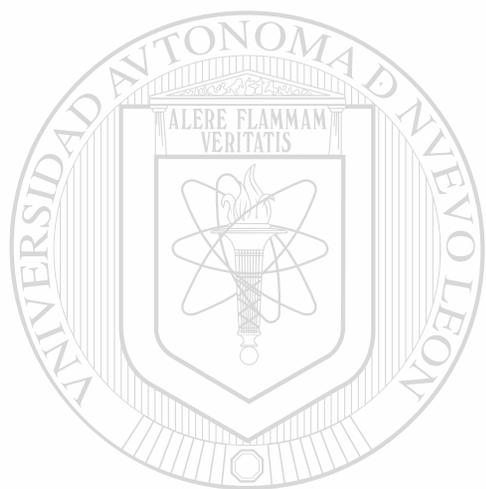
OBJETIVO PRINCIPAL

Desarrollar un formulado efectivo a base de una cepa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica contra *D. saccharalis* para su adecuada aplicación en cultivos de caña de azúcar.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecimiento de la cría de *D. saccharalis*.
2. Realizar ensayos preliminares para medir actividad tóxica de las diferentes cepas HD y nativas de *B. thuringiensis* de la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología F.C.B. U.A.N.L.
3. Detección de genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* y *cryIC* de la cepas de HD y nativas de *B. thuringiensis* que hayan resultado tóxicas contra *D. saccharalis* mediante análisis de PCR e inmunodetección de proteínas Cry.

4. Obtención de la concentración letal media (CL₅₀) y tiempo letal medio (TL₅₀) de la cepa tóxica seleccionada de *B. thuringiensis* contra larvas de *D. saccharalis* en laboratorio.
5. Producción masiva de la cepa efectiva de *B. thuringiensis*.
6. Realización de bioensayos de preferencia alimenticia para *D. saccharalis*. utilizando diferentes polímeros y fagoestimulantes.
7. Formulación del extracto de *B. thuringiensis* en forma granular y asperjable con incorporación de fagoestimulantes.
8. Evaluación de los formulados a nivel de laboratorio y de campo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



ANTECEDENTES

El concepto actual de control biológico de plagas se define como el uso de organismos vivos (nativos o modificados genéticamente), o de sus partes o productos proteicos con actividad insecticida para reducir el efecto de las poblaciones plaga. Se conocen alrededor de 10, 000 especies de microorganismos, dentro de los cuales 2000 son patógenos de insectos, destacándose como entomopatógenos 750 especies de hongos, 700 de virus, 300 de protozoarios y cerca de 100 especies de bacterias (Galán-Wong, 1993). Durante los últimos años, el control biológico ha tenido un especial interés y los esfuerzos de investigación en esta área se han incrementado sustancialmente, reflejándose en el número de productos de control biológico que hay en el mercado (Rhodes, 1993); ya que los agentes de control biológico son seguros (tienen un blanco específico), no contaminan y algunas veces son más efectivos que los químicos.

Para que un microorganismo entomopatógeno o su producto sea considerado como un agente potencial para utilizarse en el control biológico, debe cumplir con las siguientes características (Aizawa, 1974):

- 1.- Efectivo y específico contra el insecto blanco y consistente en la supresión de las poblaciones de la plaga.
- 2.- Disponibilidad y factibilidad de una tecnología de producción continua.
- 3.- Estar disponibles en formulaciones que posean una vida de anaquel larga, ser estables en el hábitat del insecto blanco y diseminarse bien para maximizar el contacto.
- 4.- No ser infeccioso o tóxico para el ser humano y su efecto en flora y fauna no blanco debe ser mínimo.
- 5.- Poseer potencial comercial.

Dentro del grupo de bacterias, *Bacillus thuringiensis* sobresale de entre los bioinsecticidas de mayor éxito comercial, ya que actualmente representa el 10% de los bioinsecticidas usados (Galán-Wong, 1993).

Bacillus thuringiensis es una bacteria gram-positiva, formadora de esporas que forma un cristal parasporal durante la fase estacionaria de su ciclo de crecimiento (Schnepf *et al.*, 1998). *B. thuringiensis* fue aislada por Shigetane Ishiwata al observar la causa de la

enfermedad del gusano de seda. Ishiwata lo llamó Sotō-Bacillen (Sotō significa en japonés "colapso repentino"). Los cristales producidos por *B. thuringiensis* están formados por una o más proteínas llamadas δ -endotoxinas o proteínas cristalinas insecticidas, estructuralmente diferentes (Kosiel *et al.*, 1993, Höfte *et al.*, 1988). Estas poseen actividad tóxica cuando son ingeridas por ciertas especies de insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera (Bradley *et al.*, 1995, Schnepf *et al.*, 1998, Höfte y Whiteley, 1989). Reportes recientes indican que aislados de *B. thuringiensis* son activos contra otros órdenes de insectos como Hymenoptera, Homoptera, Orthoptera y Mallophaga y contra nemátodos, gorgojos y protozoarios (Schnepf *et al.*, 1998).

Los llamados genes *cry* codifican para esta familia de proteínas insecticidas relacionadas (proteínas Cry). Hasta la fecha se han reportado 2 tipos de clasificaciones para genes *cry*. Estos fueron divididos por Höfte y Whiteley en 1989, en cuatro clases mayores y varias subclases caracterizadas por similitudes estructurales y el espectro insecticida de las proteínas codificadas. En base a esta caracterización, los genes *cryI* codifican para proteínas tóxicas a lepidópteros, los genes *cryII* para lepidópteros y dípteros, los genes *cryIII* para coleópteros y los genes *cryIV* para dípteros únicamente.

Posteriormente Crickmore y col. (1998) propusieron una nueva nomenclatura para los genes *cry* en base a su secuencia y no a su función, permitiendo de esta manera que las toxinas cercanamente relacionadas sean colocadas juntas, eliminando así la necesidad de parte de los investigadores de realizar bioensayos de cada nueva proteína antes de asignarle un nombre. Su definición de proteína Cry dice que es una proteína cristalina de inclusión parasporal de *B. thuringiensis* que presenta algún efecto tóxico experimentalmente verificable a un organismo blanco, o cualquier proteína que tenga similitud en la secuencia a una proteína Cry conocida, sin embargo este criterio excluye a las proteínas cristalinas que no sean tóxicas, tal es el caso de la proteína cristalina de 40 kDa de *B. thuringiensis* var. *thompsoni*, pero incluye a la proteína cristalina de 34 kDa activa contra lepidópteros que es codificada por un gen adyacente.

Modo de Acción de las toxinas de *B. thuringiensis*.

La mayoría de los estudios del modo de acción del cristal de *B. thuringiensis* se han llevado a cabo en larvas de lepidópteros, sin embargo existen reportes recientes en este

aspecto en coleópteros (Bravo *et al.*, 1992a; Lambert *et al.*, 1992.) y en dípteros (Lu *et al.*, 1994).

El modo de acción de las δ -endotoxinas propuesto es el siguiente: los cristales proteicos liberados durante la esporulación de *B. thuringiensis* son ingeridos por los insectos, los cristales son solubilizados en las condiciones alcalinas del intestino medio del insecto, las proteasas presentes en el intestino medio transforman los monómeros de protoxina en la toxina activa (δ -endotoxina). La toxina activa se une a receptores presentes en la microvellosidad apical de las células epiteliales intestinales para posteriormente insertarse en la membrana celular y formar canales iónicos, que permiten el libre flujo de iones y líquidos, lo cual constituye finalmente la causa de muerte del insecto (Höfle y Whiteley, 1989). Durante el proceso de intoxicación, tanto en lepidópteros como en coleópteros, se observan cambios histopatológicos que incluyen el rompimiento de la membrana, vacuolización del citoplasma, hipertrofia de las células epiteliales y desintegración de la célula. Después de la ingestión, los cristales se acumulan rápidamente en la membrana peritrófica, sin embargo la unión con esta membrana no se correlaciona con la toxicidad (Bravo *et al.*, 1992a). Posteriormente las proteínas son solubilizadas y procesadas proteolíticamente para liberar el fragmento tóxico (Höfte y Whiteley, 1989). Durante esta activación proteolítica, los péptidos son eliminados de los extremos amino terminal y carboxilo terminal. Para las protoxinas de 130 a 140 kDa, la activación proteolítica del extremo carboxilo terminal elimina la mitad de la molécula, resultando un fragmento tóxico de 60 a 70 kDa (Bravo, 1997). La toxina ya activada se une al receptor localizado en las microvellosidades apicales de la membrana y ocurre un cambio en la conformación de la toxina permitiendo la inserción de la toxina en la membrana, a este proceso sigue una oligomerización y este oligómero forma un poro o canal iónico, inducido por un incremento en la permeabilidad catiónica en los receptores funcionales contenidos en las vesículas de las membranas con borde de cepillo (Lorence *et al.*, 1995), pero la naturaleza de este proceso aún se desconoce (Aronson *et al.*, 1999). No se sabe si la agregación de las toxinas ocurren en la superficie de la membrana seguido de la unión al receptor, o sólo después de que las porciones de la toxina se inserten en la membrana. Además la actividad del cotrasportador de K^+ /aminoácido es directamente afectada después

de la unión de la δ -endotoxina, a la membrana de borde de cepillo (Parenti *et al.*, 1995), esto es importante porque el consumo de aminoácidos en el epitelio intestinal depende de la existencia de diferencias en el potencial eléctrico transepitelial y esta acción conduce a una interrupción en los gradientes eléctricos, de K^+ y de pH (Gill *et al.*, 1992).

De manera general, el modo de acción de la δ -endotoxina que se ha planteado, es similar en los insectos estudiados, pero se han reportado variaciones como en el caso de *Chrysomela scripta*, con el cual se utilizó *B. thuringiensis* var. *san diego*, en donde a las dos horas de haber ingerido las esporas y cristales no se observó ningún efecto, pero después de este tiempo las células intestinales aparecieron alargadas e hinchadas. Posteriormente aparecieron espacios citoplásmicos, disrupción del retículo endoplásmico rugoso, expansión del laberinto basal y desplazamiento apical del núcleo. Después de 3 horas se observó ruptura celular y vaciamiento de los materiales citoplásmicos en el lumen del intestino, *B. thuringiensis* proliferó en el intestino y produjo más cristales. Estas diferencias incluyen carencia de lesiones en la membrana, microvellosidades u organelos y una respuesta comparativamente lenta (Bauer y Pankratz, 1992). En el nematodo *Panagrellus redivivus* se ha observado que las esporas de *B. thuringiensis* germinan en el intestino, en presencia de antibióticos. La germinación de las esporas en el intestino coloniza al nematodo completo en 24 horas y estas células crecen y producen células vegetativas y esporas, pero se desconoce el mecanismo de la pérdida de actividad del antibiótico (Borgonie *et al.*, 1995).

Muchos estudios han demostrado que los cristales que son tóxicos a las larvas de ciertos insectos, se unen con una alta afinidad a las vesículas de la membrana de las microvellosidades apicales. En contraste, se ha observado, que los insectos que no son susceptibles carecen de estos sitios de unión específicos para las toxinas (Van Rie *et al.*, 1990; Denolf *et al.*, 1993a). Por otra parte se ha demostrado que ciertos insectos tienen una baja susceptibilidad para los cristales de *B. thuringiensis* debido a la ineficiente solubilización de los mismos (Höfte y Whiteley, 1998). Por lo tanto se piensa que los factores más obvios que pueden influir en el rango de hospedero de una proteína cristalina son: a) la presencia de sitios específicos de unión de la toxina (receptores), en el intestino de los diferentes insectos y b) las diferencias en el intestino larval que afectan la

solubilización y/o la eficiencia del proceso de la protoxina. Diversas investigaciones sugieren que los receptores en la microvellosidades apicales del epitelio del intestino medio son un factor clave en la determinación de la especificidad (Van Rie *et al.*, 1990; Bravo *et al.*, 1992a; Bravo *et al.* 1992b; Lu *et al.*, 1994; Estada y Ferré, 1994; Rajamohan *et al.*, 1995). Por otra parte, estudios de competencia con toxinas marcadas y sin marcar han demostrado que reconocen sitios de unión distintos en el intestino medio de *Pieris brassicae* (Höfte y Whiteley, 1989). La especificidad del hospedero puede depender de las diferencias en el ambiente del intestino medio y en las diferencias en la interacción toxina-receptor como es el caso de la toxina Cry1B (Bradley *et al.*, 1995). Esta nueva evidencia fue aportada en un estudio donde se probaron tres toxinas de *B. thuringiensis* igualmente tóxicas para *Manduca sexta*, pero diferentes en toxicidad contra *Heliothis virescens*. La unión a un receptor específico en la membrana de las células del epitelio intestinal es un factor muy importante respecto a las diferencias en el espectro insecticida de *B. thuringiensis* (Garczynski *et al.*, 1991).

Se han encontrado diferentes tipos de receptores, una proteína de unión es la aminopeptidasa N, es un péptido de 120 kDa y es específica para la toxina Cry1Ac en *Lymantria dispar* (Lee *et al.*, 1996). Existe una proteína receptora de alta afinidad que es común a la familia de las toxinas Cry1A, la cual es una proteína de tipo caderina BT-R1 que se ha encontrado en *Manduca sexta* (Keeton *et al.*, 1998), en este mismo insecto se ha detectado otro sitio de unión diferente al cual se une la biotina, evitando de esta manera la unión de la toxina Cry1Ac, este sitio es totalmente diferente al de 120 kDa de la aminopeptidasa N (Du y Nickerson, 1996). La biotilación de las proteínas cristalinas de *B. thuringiensis* es un método que se utiliza para poder seleccionar cepas tóxicas y determinar sus receptores (Denolf *et al.*, 1993b).

Algunas toxinas pueden reconocer los mismos receptores, tal es el caso de las toxinas Cry1Ab y Cry1Ac, que reconocen al mismo receptor en *Ostrinia nubilalis*, la toxina Cry1B no compite por este mismo sitio, las toxinas Cry1D y Cry1E, que no son tóxicas para *Ostrinia nubilalis*, no se unieron a ningún receptor en las microvellosidades apicales de las células epiteliales del intestino medio (Denolf *et al.*, 1993a).

Estructura de la toxina.

Se ha visto que la estructura del cristal de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* consta de multidominios compactos, esto se determinó por su resistencia a la mayoría de las proteinasas y su susceptibilidad a la proteólisis mediante papaína y pronasas (Bietlot *et al.*, 1989). Después de extensas investigaciones se ha determinado que el fragmento tóxico de la proteína cristalina de *B. thuringiensis* consiste de tres dominios estructurales distintos. El dominio I consiste de un rizo de α -hélices y se cree que es el responsable de la actividad tóxica en la membrana. En la proteína Cry3A activa contra coleópteros se ha determinado por cristalografía de rayos-x que el dominio I es un rizo de 7 α -hélices, comprendiendo 250 aminoácidos del extremo N-terminal. Estudios de mutaciones sitio-dirigidas en las α -hélices del dominio I han modificado la actividad insecticida y esto ha mostrado la importancia de la hélice α -5 en la oligomerización y quizá en otras funciones, mientras que la hélice α -4 tiene un papel más directo en establecer las propiedades del canal (Manoj-Kumar y Aronson, 1999)

El dominio II consiste de tres juegos de hoja β -plegada, cada una terminando en una asa. Existen evidencias que sugieren que el dominio II sea el responsable de la unión al receptor y especificidad de la toxina, Rang y col. (1999) remarcan la importancia del dominio II en la especificidad de la toxina, pero además sugieren que las interacciones entre el dominio I y los otros dos dominios son probablemente importantes para la actividad de la toxina.

El dominio III es una β -sandwich e incluye una región C-terminal conservada de la toxina (Rajamohan *et al.*, 1995) y se le ha atribuido la función de estabilización de la toxina, protegiéndola contra la proteólisis. En algunos insectos el dominio III juega un papel importante en la unión específica en las membranas blanco (Ballester *et al.*, 1999; Bravo, 1997). Un estudio de mutaciones sitio-dirigidas en el dominio III de Cry1Aa, indicó que este dominio puede jugar un papel en la regulación del poro o en la actividad de formación del canal (Woferberger *et al.*, 1996).

Varios autores han descrito el modo de acción de estos dominios, mostrando evidencia de que hay competencia por sitios de unión de alta afinidad y de baja afinidad

entre estas toxinas. El uso simultáneo de toxinas que comparten el mismo sitio de unión podría asociar a la resistencia con las modificaciones del sitio de unión (Fiuza *et al.*, 1996).

Toxicidad *B. thuringiensis*.

Muchos grupos de invertebrados son susceptibles a la acción tóxica del cristal de *B. thuringiensis*. Las toxinas Cry1A, Cry1B, Cry1C, Cry1D y Cry1E han sido probadas en forma de cristales puros o de cultivos esporulados (Van Frankenhuyzen *et al.*, 1992; Van Frankenhuyzen *et al.*, 1993), la toxina Cry1E ha mostrado actividad tóxica contra larvas de *Spodoptera exempta* (Bai *et al.*, 1993). El uso de cultivos esporulados y protoxinas de las cepas NRD-R y HD-1 de *B. thuringiensis*, provocó una mayor toxicidad en larvas de *Trichoplusia ni* que en larvas de *Spodoptera exigua* (Moar *et al.*, 1990). Las toxinas Cry1B, Cry1C, Cry1D y Cry1E se han probado contra *Choristoneura fumiferana*, *Orgyia leucostigma*, *Lymantria dispar*, *Malacosoma disstria*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria*, *Actebia fenica* y *Bombix mori* (Van Frankenhuyzen *et al.*, 1993), las cepas HD y NRD-12 se han probado contra *Choristoneura fumiferana*, *Lymantria dispar*, *Lambdina fiscellaria fiscellaria* y *Orgyia leucostigma* (Van Frankenhuyzen *et al.*, 1992). Algunas cepas de *B. thuringiensis* han sido también probadas contra *Galleria mellonella* y *Spodoptera littoralis* (Jarret y Stephenson, 1990), la proteína Cry2A resultó muy tóxica contra *Elasmopalpus lignosellus* (Moar *et al.*, 1995), el 4º instar de *Choristoneura rosaceana* resultó muy susceptible a *B. thuringiensis* Berliner var. *kurstaki* (Li *et al.*, 1995), *Plodia interpunctella* y *Ephestia cautella* han sido combatidos también con cepas de *B. thuringiensis* (Kissinger y McGaughey, 1979), *Cochylis hospes* es muy susceptible a *B. thuringiensis* Berliner (Jyoti y Brewer, 1999), la toxina Cry9C presentó una alta toxicidad contra *Ostrinia nubilalis* y *Diatraea grandiosella* (Reed y Halliday, 2001), *Ostrinia nubilalis* es también altamente susceptible a Cry1Ab y Cry1Ac y *Helicoverpa zea* presenta susceptibilidad a Cry1Ab (Siegfried *et al.*, 2000; Marçon *et al.*, 1999) entre otros muchos existentes.

Un solo insecto puede ser simultáneamente hospedero y ser afectado por una variedad de subespecies de *B. thuringiensis* que producen proteínas insecticidas diferentes (Itoua-Apoyolo *et al.*, 1995). O bien una proteína cristalina puede ser tóxica a una gran variedad de insectos, como la proteína Cry9Ca1, cuyo espectro de actividad incluye a las familias Pyralidae, Plutellidae, Sphingidae y Noctuidae, además es la primera proteína

cristalina con actividad insecticida hacia gusanos cortadores (Lambert *et al.*, 1996), sin embargo siempre debe tenerse en consideración que ligeras diferencias en la estructura de los toxinas, causan diferencias en el espectro de actividad (Yamamoto e Iizuka, 1983).

La manipulación genética de *B. thuringiensis* y de la proteína cristalina insecticida provee un medio de mejoramiento de la eficacia de este insecticida, así como de sus costos de producción (Baum *et al.*, 1996), por ejemplo, la utilización de baculovirus recombinantes que expresan proteínas cristalinas de *B. thuringiensis*, es una alternativa ya que la toxicidad de la proteína cristalina es la misma que la de la cepa recombinante de *Escherichia coli* y se ha utilizado exitosamente en *Spodoptera frugiperda* y *Pieris brassicae* (Martens *et al.*, 1990) también el uso de cepas recombinantes de *B. thuringiensis* utilizando lanzaderas son de valor en estudios genéticos futuros así como para el desarrollo de cepas que sirvan como plaguicidas microbianos (Baum *et al.*, 1990). En otros estudios realizados se ha colocado un gen de la proteína cristalina dentro de una cepa que contiene múltiples genes de proteína cristalina (Kalman *et al.*, 1995; Delécluse *et al.*, 1995), un caso estudiado es el del gen *cry1C* de *B. thuringiensis* var. *aizawai* que fue insertado en *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, esta cepa ahora adquiere la nueva habilidad para producir Cry1C, muestra un alto nivel de actividad y esta cepa resulta muy útil para el diseño de cepas con un espectro insecticida más amplio (Kalman *et al.*, 1995). Las partículas de fagos filamentosos tienen sistemas para la expresión de toxinas de *B. thuringiensis* biológicamente activas, son viables, infecciosos y tan letales como la toxina pura y causan su efecto cuando son ingeridos por el insecto (Kasman *et al.*, 1998).

Se ha demostrado que las esporas incrementan significativamente la potencia de la actividad de la toxina y matan a las larvas más eficientemente que la toxina sola, aún en insectos tipo II, que son aquellos que no presentan parálisis, pero dejan de alimentarse y mueren gradualmente con dosis letales de la toxina. La germinación de la espora contribuye al aumento de la actividad de la toxina y la importancia del uso de esporas viables en el control eficiente de *Plutella xylostella* ha sido demostrado (Miyasono *et al.*, 1994), tanto en larvas resistentes como en susceptibles (Liu *et al.*, 1998), así como en *Dacus oleae* una mezcla de esporas y cristales causó niveles de mortalidad más altos, más que las partes fraccionadas (Karamanlidou *et al.*, 1991). Sin embargo, se han observado casos en donde

las esporas no presentan ningún efecto sobre la toxicidad del cristal, en un estudio realizado en *Simulium vittatum* no se observó acción aditiva de las esporas y los cristales de *B. thuringiensis* HD-255, la mortalidad causada fue debida únicamente al cristal (Lacey *et al.*, 1978)

Además de las mezclas de cristales y esporas, se han ideado mezclas de entomopatógenos, sin embargo un estudio reportado por Pingel y Lewis (1999) indica que las mezclas de entomopatógenos no tienen un efecto en la mortalidad como cuando se compara con los patógenos por separado.

Existen diversos factores que intervienen en el efecto tóxico de los cristales de *B. thuringiensis*. En 1977 Nishiitsutsuji y col. encontraron que el efecto del tiempo, de la temperatura y del pH afectan fuertemente la actividad de la toxina. El efecto del pH sugiere que el ambiente altamente alcalino del intestino medio de los lepidópteros es importante no sólo para la solubilización y digestión de la proteína, sino para la expresión completa de la actividad de la misma (Gringorten *et al.*, 1992), ya que una reducción en el pH de 10.5 a 8.0 suprime fuertemente la toxicidad *in vitro* (Gringorten *et al.*, 1992). Un ejemplo claro es la toxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que es soluble a valores alcalinos mayores de 9.5 y a valores ácidos debajo de 3.5 (Bietlot *et al.*, 1989).

Por otra parte, la presencia en los cristales de los enlaces disulfuro desestabilizados y distorsionados, les permiten ser solubilizados a valores de pH de 9.5 a 10.5, lo cual es característico del intestino medio de larvas de lepidópteros y dípteros. La solubilidad de los cristales que no tienen actividad insecticida, fue hasta valores de pH mayores o iguales a 12, este hallazgo permite correlacionar la falta de solubilidad con la falta de toxicidad (Du *et al.*, 1994).

Es indudable que la composición de la protoxina presenta un efecto en la solubilidad y toxicidad, tal es el caso de la cepa de *B. thuringiensis* HD-133 var. *aizawai*, que pierde espontáneamente un plásmido que codifica para Cry1Ab, las inclusiones que produce esta cepa difieren entonces en la composición de la protoxina, solubilidad y toxicidad, como resultado de esta pérdida la inclusión requiere de un pH más alto para su completa solubilización, esto trae por consecuencia una toxicidad más baja para estas inclusiones en ciertos insectos. Esta heterogeneidad puede proveer flexibilidad hacia un amplio rango de

insectos y podría ser un importante mecanismo adaptativo para la supervivencia de estas bacterias. (Aronson, 1995).

La falta de toxicidad de los cristales de *B. thuringiensis* puede deberse no sólo a la alteración de los receptores o a una unión significativamente reducida de la toxina (Lu *et al.*, 1994), sino también a un proceso proteolítico inadecuado, en donde en la protoxina no se puedan continuar los pasos subsecuentes, como se observó en *Spodoptera litura* donde el jugo intestinal degradó completamente la toxina (Inagaki *et al.*, 1992), o el caso de la mosca *Musca domestica* cuyo jugo intestinal produjo el fragmento tóxico, pero éste fue completamente insensible al insecto sugiriendo que éste carece de los sitios de unión para el centro activo de la toxina (Ogiwara *et al.*, 1992).

La toxicidad de *B. thuringiensis* también se ve afectada por una glucosilación no enzimática que ocurre preferentemente en la cadena lateral de la lisina a pH alcalino, la cual podría ocurrir en el intestino medio de los insectos. La glucosilación de los grupos amino de la lisina podría alterar el modelo de rompimiento proteolítico, mediante la creación de un dominio resistente a proteasas, protegiendo de esta manera el sitio de rompimiento crítico que contiene a la lisina (Bhattacharya *et al.*, 1993).

Existe otro factor que influye en la actividad tóxica de una cepa determinada, la motilidad, ya que la presencia de flagelos en estas bacterias les permite unirse a las células del epitelio intestinal del insecto para causar la muerte (Zhang *et al.*, 1995).

Muchas cepas de *B. thuringiensis* se han estudiado y se ha observado que aunque presentan cristales, no han mostrado toxicidad contra una buena variedad de insectos (López-Meza e Ibarra, 1996; Galán-Wong, 1994), sin embargo esto no significa que no sean tóxicas, posiblemente no se ha encontrado el insecto susceptible a estos cristales. Algunas cepas de *B. thuringiensis* presentan muy poca toxicidad, especialmente contra larvas de *Plutella xylostella*, se cree que esta baja toxicidad es debida a que estos aislados se diferencian en células formadoras de esporas y formadoras de cristales únicamente (Zelazny *et al.*, 1994).

Genética de *B. thuringiensis*.

El material genético de *B. thuringiensis* consta de un cromosoma de entre 2.4 y 5.7 Mb y de elementos extracromosómicos (plásmidos) cuyo tamaño y número es variable

entre distintas cepas de esta bacteria (Pocar y Caballero, 2001). La presencia de plásmidos es característica de las cepas de *B. thuringiensis* y su tamaño oscila entre 2 kb a varios cientos de kb. Los plásmidos se pueden clasificar en dos grupos: plásmidos menores de 15 kb y plásmidos de elevado peso molecular, mayores de 45 kb.

Los genes *cry* están localizados en plásmidos y las proteínas que codifican tienen un rango de masa molecular de 50 a 140 kDa (Bravo, 1997). Muchas cepas de *B. thuringiensis* acarrean diferentes genes *cry*. Esta amplificación natural de genes *cry* debe contribuir a la alta producción de toxinas, sin embargo, las cepas que albergan un solo gen *cry1* tal como la HD-73 var. *kurstaki*, sintetizan cristales bipiramidales los cuales no son más pequeños que aquellos producidos por cepas que albergan 3 ó 4 genes *cry1* diferentes, tal como la HD-1 var. *kurstaki*. En base a estas observaciones, la producción de toxinas en *B. thuringiensis* no es estrictamente proporcional al número de copias de los genes *cry*. Esto sugiere que la capacidad de las cepas de *B. thuringiensis* para producir la proteína cristalina, es limitada. (Agaise y Lereclus, 1995).

El perfil de toxicidad de una especie no depende solamente del arreglo de los genes *cry*, sino de la expresión relativa de los genes (Cheng *et al.*, 1999). *B. thuringiensis* ha desarrollado un fascinante arreglo de mecanismos moleculares que producen grandes cantidades de toxinas durante la fase estacionaria (Schnepf *et al.*, 1998), lo cual es una característica común entre ellos. Sus productos generalmente se acumulan en el compartimiento de la célula madre para formar la inclusión, la cual corresponde al 20 ó al 30% del peso seco de las células esporuladas (Schnepf *et al.*, 1998). Sin embargo las cepas de *B. thuringiensis* han desarrollado por lo menos dos rutas diferentes en respuesta a la tensión de nutrientes: un período de semiquiescencia sin división y un programa de desarrollo de formación de la espora. Por lo tanto es conveniente distinguir entre los genes de la fase estacionaria que son dependientes de la esporulación y aquellos que no lo son. El gen *cry1Aa* que codifica para toxinas activas contra lepidópteros, es un típico ejemplo de un gen *cry* dependiente de la esporulación y solamente es expresado en el compartimiento de la célula madre de *B. thuringiensis*, en este caso han sido mapeados 2 sitios de inicio de la transcripción (BtI y BtII), definiendo dos promotores activados secuencialmente traslapados. BtI está activado entre T₂ y T₆ de la esporulación y BtII está activado desde T₅

(T_n es el número de n horas después del final de la fase exponencial). Por otra parte el gen *cry3Aa* aislado de *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* activo contra coleópteros, se expresa durante el crecimiento vegetativo y muy poco durante la fase estacionaria. Esto se ha observado mediante análisis de fusiones transcripcionales de *lacZ*, y experimentos de extensión de iniciadores, los cuales indican que el promotor de *cry3Aa* es débil, pero significativamente expresado durante el crecimiento vegetativo y es activado desde el final de la fase exponencial hasta la etapa II de la esporulación (T_3) y permanece activo hasta la etapa IV de la esporulación (T_7) (Schnepf *et al.*, 1998; Agaisse y Lerechus, 1995). La transcripción del gen *cry4D* de *B. thuringiensis* var. *israelensis* es inducido 9 horas después del comienzo de la esporulación y tiene un promotor fuerte y otro débil reconocidos respectivamente por la RNA polimerasa asociada a los factores σ^{35} y σ^{28} (Dervyn *et al.*, 1995).

Actualmente existe un gran número de colecciones que se componen de miles de aislados de *B. thuringiensis*, muchos de estos aislados pueden contener genes *cry* que codifiquen para proteínas con nuevas actividades biológicas o con una mayor potencia, por lo que las colecciones se someten a diversas técnicas con el fin de identificar las cepas de interés (Porcar y Caballero, 2001) o que permitan utilizarlos como marcadores para la predicción de actividades insecticidas (Chak *et al.*, 1994a). Una de las técnicas más novedosas que se han usado en este caso ha sido el análisis de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el cual rápidamente identifica y clasifica las cepas que pueden albergar cualquiera de los genes *cry* (Carozzi *et al.*, 1991; Brousseau *et al.*, 1993; Bourque *et al.*, 1993; Masson *et al.*, 1998; Ben-Dov *et al.*, 1999), además de que puede detectar la presencia de genes *cry* nuevos y conocidos en cepas de *B. thuringiensis* (Kuo y Chak, 1996). Una característica de esta técnica es que los productos de PCR tienen pesos moleculares precisos, este hecho hace evidente que nuevos genes productores de cristales puedan ser identificados (Cerón *et al.*, 1994; Cerón *et al.*, 1995; Juárez-Pérez *et al.*, 1997). Algunos ejemplos de la utilidad y aplicación clara del análisis de PCR son: el estudio realizado en México de Bravo y col. (1998) en el cual reportaron que el 49.5% de las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas alberga genes *cry1*, el 21.5% alberga genes *cry3* y el 7.9% alberga genes *cry11* y *cyt*, este trabajo contribuye para una selección de las cepa en base a

sus toxicidades y así poder desarrollar nuevas insecticidas y ampliar el espectro de acción y otro estudio es el descubrimiento del un gen tipo *cry1C* en *B. thuringiensis* var. *galleriae* (Kalman *et al.*, 1993).

Sistemas de intercambio genético.

En los sistemas de intercambio genético, existen los procesos de tipo conjugativo, en donde dos cepas de *B. thuringiensis* crecidas juntas en un mismo cultivo pueden intercambiar plásmidos con una alta frecuencia (Porcar y Caballero, 2001). Los métodos de transferencia conjugativa, en los cuales se movilizan uno o más plásmidos de una cepa a otra, se producen de modo natural en suelo y las cepas recipientes son capaces de matar insectos susceptibles (Thomas *et al.*, 2000) ya que se producen nuevas combinaciones de δ -endotoxinas dentro de las poblaciones bacterianas (Jarret y Stephenson, 1990) y especialmente en el interior de las larvas (Porcar y Caballero, 2001).

Los procesos de transformación se llevan a cabo mediante técnicas de electroporación, con los cuales se alcanzan hasta 10^6 transformantes por μg de DNA y permiten usar una gran cantidad de vectores y cepas receptoras (Porcar y Caballero, 2001), las técnicas de ingeniería genética permiten que los genes productores de toxinas de dos microorganismos puedan combinarse en un solo microorganismo y ampliar de esta manera el espectro de hospederos (Bourgouin *et al.*, 1990). Un ejemplo evidente es el uso del vector de expresión PE G434 con el cual se mejora el potencial del cristal insecticida y permite que la producción de la δ -endotoxina no dependa de la esporulación (Mettus y Macaluso, 1990). En otro trabajo a nivel de laboratorio, se transfirieron genes productores de toxinas de *B. sphearicus* 1593 en *B. thuringiensis* var. *israelensis*, teniendo un alto nivel de expresión y la misma toxicidad hacia mosquitos (Bourgouin *et al.*, 1989). Chang *et al.*, 1993 reportaron que la expresión de una proteína cristalina en una cepa de *B. thuringiensis* acristalífera, es más eficiente cuando una chaperonina está presente. La presencia de esta proteína de 20kDa no se requiere para la producción de altos niveles de CytA o Cry4D en *B. thuringiensis*, pero en la cepa acristalífera aumenta grandemente la producción. La fusión de dos genes truncados pertenecientes a las clases *cry1Ab* y *cry1C*, dio como resultado la expresión de una proteína biológicamente activa con un espectro insecticida que sobrepasó a aquella de ambos cristales contribuyentes (Honée *et al.*, 1990). La

introducción de genes de la proteína cristalina que codifican para proteínas específicas a varias plagas de importancia agronómica en organismos que pueden sobrevivir en la filósfera de plantas de cultivo blanco por períodos prolongados, es una buena alternativa (Bora *et al.*, 1994). Otro estudio de esta misma índole es el que se realizó en *Clavibacter xyli* var. *cynodontis* al cual se le introdujo el gen *cry1Ac* para combatir a *Ostrinia nubilalis* con excelentes resultados, demostrando que el uso de bacteria endofíticas mediante ingeniería genética es una alternativa plausible para el control de insectos (Lampel *et al.*, 1994). En otro estudio se demostró que *cry2A* puede ser expresado en *Escherichia coli*, *B. thuringiensis* y *B. cereus*, debido a que muchas bacterias evaluadas para el filoplano son *B. cereus*, esta investigación podría ayudar a establecer el rango de posibles transformaciones (Moar *et al.*, 1994). La transformación mediante la infección con *Agrobacterium tumefaciens* es actualmente el método más usado para la introducción y expresión de genes foráneos en células vegetales y la posterior regeneración en plantas transgénicas. *Agrobacterium tumefaciens* es una bacteria fitopatógena que infecta naturalmente a las dicotiledóneas y que tiene la particularidad de transferir una parte de su DNA al genoma de la planta. Actualmente los cultivos transgénicos que se han comercializado son el algodón que expresa la toxina *Cry1Ac*, la papa que expresa *Cry3A* y el maíz que expresa la toxina *Cry1Ab* (González-Cabrera, 2001).

Desde un punto de vista general, la clonación, expresión y caracterización de los genes que codifican para las proteínas cristalinas en otras bacterias u organismos (Von Tersch *et al.*, 1991; Chak *et al.*, 1994; Chang *et al.*, 1992) han resultado muy exitosas en la construcción de nuevas cepas de *B. thuringiensis* presentando una pluralidad en sus especificidades del hospedero (Lecadet *et al.*, 1992).

Resistencia.

La resistencia es una disminución en la susceptibilidad con bases genéticas de una población a un insecticida, es por definición un fenómeno evolutivo.

Para validar la resistencia, se debe demostrar que los tratamientos repetidos con un insecticida han causado un incremento significativo en la cantidad de insecticida necesario para matar a cierta proporción de una población (Ej: LC_{50}), o una disminución significativa

en el porcentaje de mortalidad por una determinada cantidad de insecticida (Tabashnik 1994a).

Los insectos en los cuales se ha observado el problema de la resistencia han sido principalmente *Plutella xilostella* y *Plodia interpunctella*, en pruebas de laboratorio y en campo causada por plantas transgénicas (Bolin *et al.*, 1999; Venette *et al.*, 2000), sin embargo a nivel de laboratorio se ha podido inducir resistencia en *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* (Gould *et al.*, 1995; Lee 1995b), *Ostrinia nubilalis* (Bolin *et al.*, 1999; Venette *et al.*, 2000) y *Lymantria dispar* (Rossiter *et al.*, 1990). En este proceso la edad de las larvas juega un papel significativo, resultando más susceptibles las larvas de los primeros instares (Liu *et al.*, 1995). La rápida respuesta a la selección en laboratorio, muestra variación genética entre la población en la susceptibilidad a *B. thuringiensis* y sugiere que la intensa selección puede producir niveles mucho más altos de resistencia a *B. thuringiensis* que aquellos que se reportan en campo (Tabashnik *et al.*, 1991).

El mecanismo principal de resistencia que ha sido identificado, es la unión reducida de la toxina de *B. thuringiensis* a la membrana de borde de cepillo del epitelio del intestino medio en el caso de *Plodia interpunctella* y *Plutella xilostella* (Tabashnik, 1994b), quizá por las alteraciones en las proteínas de unión (Lee *et al.*, 1995a) o la reducida conversión de protoxina a toxina (Liu *et al.*, 2000).

La resistencia cruzada existe cuando dos cepas de *B. thuringiensis* comparten el mismo gen, aún cuando se use una proteína diferente para atacar al insecto (Tabashnik *et al.*, 1993; Tabashnik *et al.*, 1994b).

Existen programas del manejo de la resistencia. El desarrollo de estrategias para manejar la resistencia requiere del entendimiento de la herencia de la resistencia en una población de plagas. La mejor estrategia que retrasa más la resistencia debe hacerse en base al número de alelos y la herencia de este rasgo dentro de la población (Bauer 1995; Kennedy y Whalon, 1998). Los estudios de la genética de la resistencia típicamente involucran la determinación de la susceptibilidad de la progenie de cruza entre individuos de poblaciones seleccionadas y sin seleccionar. En *Plutella xilostella* y *Plodia interpunctella*, la resistencia es autosómica, parcialmente recesiva y aparentemente debida a uno o unos pocos loci, en *Heliothis virescens* es parcialmente recesiva y debida a un solo

locus o loci fuertemente ligados (Gould *et al.*, 1995), en *Leptinotarsa decemlineata*, la resistencia también es autosómica y conferida por un gen de dominancia incompleta (Bauer, 1995).

Desafortunadamente, la resistencia en una población es probablemente la consecuencia inevitable del uso de insecticidas. Las estrategias involucradas en el manejo de la resistencia son: 1) la diversificación de las fuentes de mortalidad para evitar la selección por un solo mecanismo (Bauer, 1995), como la combinación de *B. thuringiensis* con parasitoides, ya que estos últimos pueden disminuir la evolución de la resistencia al plaguicida (Chilcutt y Tabashnik, 1999), 2) la reducción de la presión selectiva, 3) el mantenimiento de individuos susceptibles por medio de refugios y el fortalecimiento de la inmigración, 4) el monitoreo del incremento de la resistencia a cualquiera de los agentes de mortalidad y 5) la respuesta a la resistencia a través de estrategias de manejo diseñadas a reducir la frecuencia de la resistencia (Bauer, 1995). Estas estrategias incluyen: 1) mezclas de toxinas con diferentes mecanismos, 2) sinérgicos para incrementar la toxicidad, 3) rotaciones de toxinas alternativas, temporalmente, para reducir la frecuencia de individuos resistentes (Leibee *et al.*, 1995; Bauer, 1995), 5) dosis bajas de toxinas que produzcan efectos subletales, tales como fecundidad reducida o desarrollo lento, favoreciendo otros factores de mortalidad, 6) dosis ultra-altas de toxinas para matar homocigotos y heterocigotos resistentes (Huang *et al.*, 1999; Bauer, 1995), 7) regulación de genes para dosificación de la toxina, localización e inducción (Bauer, 1995), 8) refugios para proveer una fuente de individuos susceptibles que puedan cruzarse con individuos resistentes y asegurar una descendencia heterocigota (Huang *et al.*, 1999).

La utilización de proteínas Cyt puede ser muy útil en el manejo de la resistencia a Cry3A y posiblemente a otras toxinas Cry usadas en los insecticidas microbiales y plantas transgénicas, tal es el caso de Cyt1Aa cuya toxicidad se ha demostrado en *Chrysomela scripta* (Federici y Bauer, 1998). Bentur y col. (2000) determinaron que la frecuencia de alelos que confieren resistencia a *cry1Ab* en *Scirpophaga incertulas* se acerca a un valor de 0.001 como un valor máximo que puede hacer posible la implementación exitosa de estrategias de dosis altas/refugios.

Formulaciones.

El descubrimiento de *B. thuringiensis* como insecticida microbiano permitió que en la década de 1930 se iniciara en Europa el uso de éste como agente de control de insectos. Durante las dos siguientes décadas se realizaron pruebas de campo contra varios insectos lepidópteros en Europa y Estados Unidos (Cerón, 2001). El Sporeine® fue el primer producto comercial y estuvo disponible en Francia en 1938 para el control del gusano barrenador de harina (Aronson *et al.*, 1986). Esto condujo a la investigación, desarrollo y comercialización de productos a base de *B. thuringiensis*.

Actualmente existen una gran variedad de formulaciones de *B. thuringiensis* que están comercialmente disponibles y la mayor aplicación de estos productos se dirige al control forestal y agrícola de lepidópteros (Rhodes, 1993).

Diversas cepas de *B. thuringiensis* han sido formuladas utilizando una gran variedad de soportes y de técnicas. El mercado de estos bioinsecticidas ha sido dominado por productos que contienen como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas y la cepa HD-1 ha sido muy utilizada para el control de plagas agrícolas y forestales.

Los productos insecticidas a base de *B. thuringiensis* se clasifican en: productos de primera generación, que son aquellos cuya formulación incluye como ingrediente activo una mezcla de cristales y esporas de una cepa nativa de *B. thuringiensis*. Estos constituyen la mayor proporción de productos comerciales y corresponden al 84% de un total de 75 productos registrados (Tabla 1). Los productos de segunda generación son aquellos que están constituidos por una mezcla de esporas y cristales provenientes de una cepa de *B. thuringiensis* a la cual se introdujeron por conjugación o transformación, los genes que codifican para las δ -endotoxinas presentes en varias cepas nativas (Tabla 2) ampliando así su espectro de actividad hacia otros insectos plaga. Los productos de tercera generación, que 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*, los cuales se conocen como CellCap® (Tabla 3) (Cerón, 2001).

Las δ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, las cuales actúan exclusivamente por ingestión, han adquirido un inusitado protagonismo en el campo de la sanidad vegetal, por

Tabla 1. Productos comerciales de cepas nativas de *B. thuringiensis*

Compañía	Nombre comercial	Variiedad	Blanco	Proteínas	Presentación	Uso
	Dipel, BiobiXL Foray	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo seco, granulado, Emulsión suspension, polvo humectable, líquido concentrado.	Jardín, forestal invernaderos, hortalizas plantas ornamentales.
	Gnatrol, Bactimos, VectoBac	<i>israelensis</i>	Dipteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1 11Aa1 CytAa	Granulado, suspensión acuosa, polvos, Pelletst,	Lagos, agua estancada, salud pública, canales.
Abbott Labs.	DiTera	<i>tenebrionis</i>	Coleópteros	3Aa3	Concentrado acuoso	Protección de cultivos, papa, tomate, forestal, plantas ornamentales
	Florbac Xentari	<i>aizawai</i> <i>aizawai</i>	Lepidópteros Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1 1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1	Polvo humectable Granulado humectable	Protección de cultivos, Hortalizas, invernadero, frutales, plantas ornamentales.
	Futura DibActa	<i>kurstaki</i> N.D.	Lepidópteros N.D.	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1 β -exotoxina	Polvo humectable Suspensión acuosa	Protección de cultivos, N.D.
All Union Inst. Agr. Microbiol.	Biotoxksbacillin	N.D.	N.D.	β -exotoxina	Suspensión acuosa	N.D.
American Cyanamid	Acrobe	<i>israelensis</i>	Dipteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Suspensión acuosa	Salud pública
Bactec	Berman Bt	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable Granulado, Polvo seco	Invernadero, productos almacenados
Biochem Products	Bactmos	<i>israelensis</i>	Dipteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Granulado humectable Suspensión acuosa	Salud pública

Tabla 1. (Continuación). Productos comerciales de cepas nativas de *B. thuringiensis*.

Compañía	Nombre comercial	Variiedad	Blanco	Proteínas	Presentación	Uso
Chamapol-Biokma	Bathurin	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable, gránulos	Protección de cultivos
Compagnia di Ricerca chim. CRC	Bactis	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Suspensión acuosa, polvos humectables, granulado.	Salud pública
	Bactucide	<i>israelensis</i>	Dipteros	4Aa1, 4Ab1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Polvo humectable, líquido concentrado	Forestal, jardín, Protección de cultivos
	Exobac	N.D.	N.D.	β -exotoxina	Suspensión acuosa,	N.D.
	Biospor	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B	Polvo asperjable	Protección de cultivos
Fermenta ASC Co.	Cutlass	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa, 1Ab, 1Ac, 2A, 2B	Polvo humectable,	Hortalizas
Farmos	Muscabac	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	β -exotoxina	N.D.	N.D.
Glavmüro-bioprom	Dendrobacillin	<i>dendrolimus</i>	Lepidópteros	N.D.	Polvo, peilest	Protección de cultivos
	Endobacterin	<i>galleriae</i>	Lepidópteros	1Cb1	Polvo humectable,	Protección de cultivos
	Ekstoksín	<i>tolworthi</i>	N.D.	β -exotoxina	N.D.	N.D.
	Insektin	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	1Ba1	Polvo,	Protección de cultivos
	Toxobakterin	<i>tolworthi</i>	N.D.	β -exotoxina	Suspensión acuosa	N.D.
Huazhong Agricultural University	Mianfeng pesticide	Ybt-1520	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Frutales, algodón, maíz, hortalizas
	Shuangdu preparat	Chinesensis-Ct-43	Lepidópteros Coleópteros	N.D.	Polvo humectable	Forestal, algodón jardín, maíz
	JieJuejing preparat	<i>israelensis</i> -187	Dipteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	N.D.	Agua residual, drenajes
	MieJuejing preparat	<i>israelensis</i> -187-cs8	Dipteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa, CytAa2	N.D.	Agua estancada, arroz

Tabla 1. (Continuación). Productos comerciales de cepas nativas de *B. thuringiensis*

Compañía	Nombre comercial	Variiedad	Blanco	Proteínas	Presentación	Uso
ICI Americas, Inc.	Ecodart	N.D.	N.D.	N.D.	Polvo, peilfest	N.D.
Jewing-Joffe Industry Limited	Bitayon	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Protección de cultivos
Knoll Bioproducts	Larvo-Bt	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Korea Explosives	Bt	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo asperjable, polvo humectable	Protección de cultivos
Kyowa-Hakko Kogyo Co.	Selectgyn	<i>aizawai</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ba1, 1Ca1, 1Da1	Polvo humectable	Protección de cultivos
LIBEC	Sporine	<i>hurstaki</i>	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	<i>tenebrionis</i>	Coleopteros	3A	Solución asperjable	Protección de cultivos
	M-Peril	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Forestal, jardín, papa
Novo Nordisk	Biobit	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
	Foray	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Forestal, campo de golf
	Novodor	<i>tenebrionis</i>	Coleópteros	3A	Polvo asperjable	Protección de cultivos
	Skeetal	<i>israelensis</i>	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Solución acuosa, briquetas	Salud pública
Nor-Am Chemical	SOK	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Phillips Duphar	Bactospeine	<i>hurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable, polvo asperjable	Protección de cultivos, plantas ornamentales, invernadero
	Bactimos	<i>israelensis</i>	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Polvo seco, briquetas, polvo humectable	Salud pública, canales, agua residual

Tabla 1. (Continuación). Productos comerciales de cepas nativas de *B. thuringiensis*

Compañía	Nombre comercial	Variiedad	Bianco	Proteínas	Presentación	Uso
Procida	Plantibac	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Radonja	Banurad	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo	Protección de cultivos
	Nubilacid	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Salud pública
Scientific & Technology Developing	Bt 8010, Rjijn	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas, algodón, árboles frutales, arroz plantas ornamentales
SDS Biotech K.K.	Delfin, Thuricide	N.D.	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas. Forestal
	Able	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	N.D.	Polvo humectable	Hortalizas
	Teknar	<i>israelensis</i>	Dípteros	4Aa1, 4Ba1, 10Aa1, 11Aa1, CytAa	Líquido concentrado	Lagos, pozos, riveras, agua estancada
Thermo Trilogy Corporations	Thuricide	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Hortalizas, forestal
	Javelin, Delfin	<i>kurstaki</i> -SAH	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Forestal, hortalizas, Protección de cultivos
	CoStar	<i>kurstaki</i> -SA12	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Frutales, forestal
	Steward	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Trident	<i>tenebrionis</i>	Coleópteros	3Aa1	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Vault	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo humectable	Protección de cultivos
Shionogi Co	Bacillex	<i>thuringiensis</i>	Lepidópteros	β -exotoxina	N.D.	N.D.
Thompson Hysward Co.	Bactur	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo asperjable, Granulado humectable	Salud pública protección de cultivos
Towagosei Chem	Toaro, Toaro-Ct	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	1Aa1, 1Ab1, 1Ac1, 2Aa1, 2Ab1	Polvo, granulado	Protección de cultivos
Tutikorn Alkali and Fertilisers Limited	Spicturnin	<i>gallerias</i>	Lepidópteros	1Cbl	Líquido concentrado	Col, repollo, coliflor

Adaptado de Cerón (2001). N.D: No Determinado.

Tabla 2. Productos recombinantes comerciales de *B. thuringiensis*

Compañía	Nombre comercial	Variedad	Bianco	Proteínas	Presentación	Uso
Abbott Labs.	Novodor	<i>senebionis</i> NB176	Coleópteros	3Aa3	Concentrado acuoso	Protección de cultivos. papa, tomate, forestal, plantas ornamentales
Ecogen Inc.	Lepinox [R]	<i>kurstaki</i> ED7826	Lepidópteros	1Aa, 1Ac, 2A, 1F-1Ac [R]	Granulado, Granulado humectable	Protección de cultivos, maíz dulces, césped
	Crymax	<i>kurstaki</i> ED7841	Lepidópteros	1Ac, 2A, 1C [R]	Granulado, granulado humectable	Hortalizas plantas ornamentales
	Raven	<i>kurstaki</i> EG7673	Coleópteros	1Ac, 3A, 3Bb [R]	Polvo humectable	Papa, tomate
	Candor	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	Transconjugante	Emulsión suspensión	Forestal
	Cutlass (T)	<i>kurstaki</i>	Lepidópteros	Transconjugante	Polvo humectable	Hortalizas
	Foil OF	<i>kurstaki</i> EG2424	Lepidópteros	1Ac, 3Aa (T)	Polvo humectable	Protección de cultivos.
	Foil BFC		Coleópteros		Polvo asperjable	
Thermo Trilogy Corporation	Agree	<i>aizawai</i> -GC91	Lepidópteros	Transconjugante	Granulado humectable	Protección de cultivos
	Design	<i>aizawai</i>	Lepidópteros	Transconjugante	Granulado humectable	Hortalizas

Adaptado de Cerón (2001).

Tabla 3. Productos comerciales recombinantes de *B. thuringiensis* en *Pseudomonas*.

Compañía	Nombre comercial	Variiedad	Bianco	Proteínas	Presentación	Uso
Mycogen	Matich [R]	<i>Pseudomonas</i> (EC)	Lepidópteros	Encapsulado	Encapsulado	Protección de cultivos Forestal, jardín, papa
	Mitrak [R]	<i>Pseudomonas</i> (EC)	Coleópteros	3A (Encapsulado)	Encapsulado	
	MVP [R]	<i>Pseudomonas</i> (EC)	Lepidópteros	Encapsulado	Encapsulado	

Adaptado de Cerón (2001).

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

su manifiesta especificidad para insectos e inocuidad para depredadores y parasitoides. Además como su toxicidad para vertebrados es casi nula (Santiago-Alvarez y Quesada-Moraga, 2001; Quintero, 1997), *B. thuringiensis* es considerado como uno de los insecticidas más seguros autorizándose su empleo sobre los más diversos cultivos, incluso sin imposición de plazo de seguridad. Esto ha conducido a la producción de insecticidas, sujetos a continuos avances tanto por la inclusión de cepas cada vez más activas o con nuevas especificidades, como por el desarrollo de formulaciones asequibles, sin embargo su empleo se ha visto limitado por el rápido descenso de la eficacia en aplicación foliar, a causa de la inactivación de los rayos UV y otros factores, además de su baja persistencia en suelo debido a la degradación microbiana (Santiago-Alvarez y Quesada-Moraga, 2001).

En el afán de encontrar una formulación adecuada de *B. thuringiensis* y teniendo como finalidad ponerlas en contacto con las células epiteliales del intestino medio de los insectos, se han estudiado y diseñado una gran cantidad de formulaciones. Uno de los polímeros que se ha utilizado con más éxito para estas formulaciones, es el almidón de maíz (McGuire y Shasha, 1990; McGuire y Shasha, 1992; McGuire *et al.*, 1996; Gillespie *et al.*, 1994; Tamez-Guerra *et al.*, 1996; Dunkle y Shasha, 1988; McGuire *et al.*, 1990; Bartelt *et al.*, 1990), ya que éste presenta ventajas sobre otros soportes como las partículas de maíz quebrado, de arcilla o de salvado de trigo, debido a que éstas no se adhieren a las superficie de las hojas y están restringidas a usarse en el cogollo del maíz, o en la superficie del suelo para el control de plagas de esta área (Gillespie *et al.*, 1994). Otro soporte utilizado con éxito ha sido la harina de maíz (McGuire *et al.*, 1996; Tamez-Guerra *et al.*, 1996; Ridgway *et al.*, 1996), al igual que la gelatina y la pectina (Morales-Ramos *et al.*, 2000). Estos últimos han demostrado una retención de la actividad tóxica de *B. thuringiensis* por 12 meses (Morales-Ramos *et al.*, 1998). La quitina y el alginato también se han utilizado como soportes, en formulaciones contra *Trichoplusia ni* sin embargo éstos no fueron tan aceptados por las larvas de este insecto (Morales-Ramos *et al.*, 1998). La harina de maíz nixtamalizada que también se utilizó como soporte, retuvo la actividad tóxica de *B. thuringiensis* por dos años (Tamez-Guerra *et al.*, 1998).

Estas formulaciones han tenido que ser ampliamente mejoradas debido a que el comportamiento de los insectos es un fenómeno complejo. Se han hecho muchos esfuerzos

para aumentar la efectividad en campo de los insecticidas microbianos y estos avances tienden a enfatizar el uso de materiales específicos o métodos para alcanzar un efecto particular deseado. Los adyuvantes son el tipo de sustancias utilizadas y las características que deben de tener son: estimulante del gusto, protección a la luz solar y retardo en la evaporación (Ignoffo *et al.*, 1976).

En base a esto, diversos químicos han sido utilizados por el efecto que causan en el insecto. A continuación se describe la clasificación propuesta por Dethier *et al.*, 1960:

Atrapante: es aquel químico que hace que los insectos se pongan en contacto con él. El mecanismo de agregación tiene un componente cinético.

Estimulante de la locomoción: es un químico, el cual por un mecanismo cinético, hace que el insecto se disperse desde una región, más rápidamente que si el área no contuviera dicho químico. este efecto puede incrementar la velocidad de locomoción.

Atrayente: es un químico que hace que el insecto tenga movimientos orientados hacia su fuente.

Repelente: es un químico que hace que el insecto se aleje de su fuente.

Estimulante: es un químico que favorece o ayuda a la oviposición, el cruzamiento o la alimentación. Estimulante alimenticio es sinónimo de fagoestimulante.

Inhibidor: es un químico que bloquea la alimentación o la oviposición cuando está presente en un lugar, donde los insectos en su ausencia podrían alimentarse y ovipositar normalmente.

Los inhibidores alimenticios han sido estudiados por su potencial para proteger a las plantas, mediante la reducción de la alimentación por parte de los insectos. Los fagoestimulantes tienen el uso contrario, sin embargo su uso ha sido limitado debido a las dudas que han surgido sobre su persistencia en campo y costo, pero indiscutiblemente, el uso de fagoestimulantes aumenta la eficacia de tales productos mediante el incremento en la cantidad de insecticida ingerido o a la tasa a la cual es ingerido (o ambos) (Farrar y Ridgway, 1994).

Desde hace varias décadas se ha demostrado la utilidad de los fagoestimulantes en las formulaciones, debido a que la palatabilidad es un factor muy importante cuando el entomopatógeno tiene que ser ingerido para ser efectivo (Guillespie *et al.*, 1994). Los

extractos de algodón mostraron potencial como fagoestimulantes en *Anthonomus grandis* (Keller *et al.*, 1962; Maxwell *et al.*, 1963). Guerra y Shaver (1968) demostraron que el extracto acuoso de granos de maíz estimulaba más la alimentación por parte de las larvas de *Heliothis virescens*, comparado con los extractos acuosos de algodón, pelos de maíz y pétalos de flores de algodón, los extractos de maíz dulce adicionados a insecticidas químicos mostraron su efectividad como fagoestimulantes (McMillian *et al.*, 1968). Las larvas de *Lymantria dispar* prefirieron el follaje tratado con melazas al follaje sin tratar (Yendol *et al.*, 1975), otro fagoestimulante que dio buenos resultados consistió de una mezcla de harina de semilla de algodón, azúcar, aceite de semilla de algodón y Tween 80 (Bell y Romine, 1980), esta mezcla está ahora comercialmente disponible con el nombre de Coax®.

Otros estudios se han encaminado al establecimiento de metodologías con el fin de seleccionar fagoestimulantes adecuados (Guerra y Shaver, 1968; Bartelt *et al.*, 1990). Un estudio que demuestra claramente la selección de un fagoestimulante es el realizado por Gillespie, *et al.*, 1994 donde observó que el uso de hojas de algodón y el Coax® (fagoestimulante comercial) son fagoestimulantes ampliamente aceptados por las larvas de *Ostrinia nubilalis*, la melaza usada como fagoestimulante causa una palatabilidad intermedia y aquellas formulaciones que contenían CaCl_2 fueron totalmente rechazadas por este insecto (Gillespie *et al.*, 1994). Otros compuestos que se han utilizado como fagoestimulantes son el aceite vegetal (Tamez-Guerra *et al.*, 1999) como el aceite de maíz (Bartelt *et al.*, 1990) o, el azúcar pulverizado, el follaje de maíz deshidratado, el germen de trigo, la caseína, las mezclas de sales, los suplementos vitamínicos, el hexano y el etanol (Bartelt *et al.*, 1999). Aparte del Coax® existen algunos otros de tipo comercial como Pheast®, Gusto®, Entice® y Mo-Bait®. Estos junto con el Coax® han sido comparados en el comportamiento alimenticio que causan a varias especies de lepidópteros, provocando una alta respuesta aquellos que contienen altos porcentajes de proteína en lugar de aquellos que contienen azúcares principalmente (Farrar y Ridgway, 1994). El Coax® y el Gusto® tuvieron un claro efecto en la mortalidad de *Heliothis* sp (Jonson, 1982), ya que causaron un efecto en la alimentación de la larva y en las características de aspersión del formulado (Luttrel *et al.*, 1983). Pero esta respuesta puede variar de un insecto a otro.

Existen además otros factores que influyen en la efectividad de un bioinsecticida, la luz solar es indudablemente uno de los factores más importantes que afectan la estabilidad de los principales grupos de entomopatógenos tales como bacterias, hongos, virus y protozoarios, se ha observado que entre los agentes entomopatógenos, los virus son de los más sensibles a la luz solar (Ignoffo *et al.*, 1997). La vida media de estas especies expuestas a la luz solar es menor a 3 días (Ignoffo y García, 1978).

Algunos estudios al respecto realizados hace algunas décadas indicaron la presencia de alguna sustancia producida por la radiación del ultravioleta cercano que reducía tanto la viabilidad como la patogenicidad de estos agentes biológicos y sugirieron que esta sustancia podría ser el peróxido de hidrógeno resultante de la fotooxidación de uno o más aminoácidos (Ignoffo y García, 1978; Ignoffo *et al.*, 1977). El espectro de actividad de 290-400nm de la radiación ultravioleta es el factor más destructivo (Ignoffo *et al.*, 1997). Sin embargo en el caso específico de *B. thuringiensis*, la temperatura de la hoja y la deficiencia en la presión de vapor afectan la viabilidad y patogenicidad de la espora, inclusive la luz reflejada en el envés de las hojas es suficiente para causar mortalidad en las esporas de *B. thuringiensis*. La temperatura en conjunto con la radiación solar tienen un influencia negativa en la viabilidad de las esporas (Leong *et al.*, 1980).

El surgimiento de estos problemas ha conducido al uso de diferentes químicos orgánicos que tengan la función de protectores contra la luz solar. El rojo congo ha dado magníficos resultados ya que tiene una absorbancia excelente en un rango de 280-400nm, por lo que ha sido considerado para brindar protección efectiva contra la inactivación solar de los entomopatógenos (Shapiro, 1989), este colorante demostró su efectividad al proteger la actividad insecticida de las esporas, cuando se utilizó en formulaciones granulares hechas a base de gelatina, pectina o almidón (Morales-Ramos *et al.*, 2000). Ignoffo y Batzer, 1971 utilizaron como agentes protectores de luz solar una mezcla del colorante búfalo negro más aceite, otra mezcla de Carbo-Jet negro más agua, celulosa, carbón, polvo de aluminio y óxido de aluminio, proporcionando buenos resultados el carbón, la mezcla de búfalo negro más aceite y el polvo de aluminio. En unas formulaciones que se desarrollaron para el virus de la polihedrosis nuclear, se incorporaron protectores contra la radiación ultravioleta,

resultando notablemente tolerantes el dióxido de titanio y el negro carbón (Bull *et al.*, 1976).

Una oportunidad para mejorar la supervivencia en campo es eliminar los plásmidos crípticos ya que se ha visto que provocan sensibilidad de la célula a los rayos UV y mover los genes de las protoxinas al cromosoma, aumentando de esta manera la supervivencia de las células y esporas sin perder su capacidad para producir la toxina (Benoit *et al.*, 1990).

Otros aditivos como los abrillantadores ópticos se han utilizado como protectores contra la radiación ultravioleta, Shapiro y Robertson (1992), al trabajar con un virus para el control de *Lymantria dispar*, postularon que los abrillantadores ópticos inhiben o alteran la membrana peritrófica quitinosa, creando una rasgadura en el revestimiento del intestino, de esta manera el virus puede penetrar la membrana dañada, pasar desde el lumen del intestino hasta el hemocele e infectar a las células susceptibles. Existen muchos otros aditivos que se han utilizado en las formulaciones con diferentes finalidades, por ejemplo, el ácido tánico ha sido aplicado como un aditivo barato que incrementa la eficacia de las concentraciones subletales de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, el ácido tánico simula los constituyentes activos contenidos en el extracto acuoso rico en taninos de la corteza de *Taxus baccata*, que retarda el desarrollo de las larvas de *Heliothis virescens* (Gibson *et al.*, 1995), sin embargo hay discrepancia entre autores, Lord y Undeen (1990) comentan que los taninos tienen la habilidad de unirse a proteínas como las L-endotoxinas y las enzimas, lo cual puede causar una pérdida de la eficacia. La presencia de taninos en ciertos ambientes puede disminuir la toxicidad de *B. thuringiensis* haciendo que se requieran aplicaciones más fuertes. Las formulaciones a base de agua, que contienen el virus de la polihedrosis nuclear de *Heliothis* sp, ha producido mortalidades significativamente más altas en *Heliothis zea* en pruebas de laboratorio cuando se adiciona harina de soya, maíz o componentes de semilla de algodón y azúcares. (Smith *et al.*, 1982). Otros componentes como el almidón de maíz pregelatinizado combinado con azúcar pulverizado agregado como aditivo para soluciones asperjables, ha dado buenos resultados para la protección de *B. thuringiensis* (McGuire *et al.*, 1996). La mezcla de harina de maíz nixtamalizada, aceite vegetal (añadido como fagoestimulante), azúcar pulverizado, 2-propanol, verde de malaquita y formaldehído y secada por aspersión, demostró en bioensayos con plantas de algodón, una mejor protección contra la radiación

solar comparada con las mismas mezclas que no fueron secadas por aspersión (Tamez-Guerra *et al.*, 1999), también la técnica de encapsulación en matrices de arcilla-alginato ha sido empleada para la liberación de agentes de control biológico dando buenos resultados (Fravel *et al.*, 1985). Estas técnicas junto con los componentes empleados influyen grandemente en la estabilidad del producto. La cafeína al 0.1% es un útil adyuvante para suspensiones asperjables de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, ya que incrementa la toxicidad del organismo y reduce la actividad alimenticia de las larvas de *Mamestra configurata*, en plantas de canola y con un bajo costo (Morris *et al.*, 1994). En un estudio se observó que el girasol tiene altas cantidades de ácidos fenólicos, como el ácido *p*-cumárico o cinámico y la presencia de éstos incrementa la efectividad de *B. thuringiensis* como un agente para el control de *Homoeosoma electellum*, que es la palomilla del girasol, lepidóptero de la familia Pyralidae, la presencia de estos ácidos permite bajos niveles de aplicación (Brewer y Anderson, 1990).

La persistencia de *B. thuringiensis* en campo depende mucho del tipo de formulación, es decir, de los soportes o aditivos utilizados para tal fin, además de la lluvia y de la radiación solar. Van Frankenhuyzen y Nystrom (1989) observaron que aunque el Thuricide 48LV® es una formulación acuosa de alta potencia, tiene una toxicidad residual menor a dos días, a pesar de la fuerte aspersión del follaje, indicando que una alta concentración de ingredientes activos no mejora la residualidad en las hojas o la adherencia deseable, por otra parte Behle y col. (1997), reportaron que la actividad tóxica de formulaciones como el Dipel 2X® y de otras a base de caseína, gluten y harina/sacarosa, se pierde a los dos días de estar expuesto a la luz solar, pero la caseína utilizada en formulaciones asperjables, aplicadas en hojas de algodón resistieron el lavado de la lluvia simulada y retuvieron más del 60% de la actividad insecticida original de tratamientos no expuestos, comparado con menos del 20% de la actividad original para preparaciones de *B. thuringiensis* no formuladas o formuladas comercialmente. Además la caseína brinda cierta protección contra la degradación inducida por la luz (Behle *et al.*, 1996). Se ha visto que las formulaciones a base de *B. thuringiensis* encapsuladas en almidón, tienen una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias, lo cual puede ayudar mucho cuando se trata de cultivos de campo (McGuire *et al.*, 1994). La harina de maíz pregelatinizada con lignina

se ha utilizado en formulaciones de *B. thuringiensis* y baculovirus mejorando la actividad residual y evitando el lavado por la lluvia (Tamez-Guerra *et al.*, 2000a y b).

Caña de azúcar.

La caña de azúcar es originaria de Nueva Guinea (Isla del norte de Australia), en donde se le ha encontrado en semicultivo, de ahí se dispersó por los primitivos viajeros en Oceanía, hacia la India, donde tuvo dos consecuencias importantes. La primera fue la invención del proceso de convertir el jugo de la caña en azúcar, desde hace unos 3000 años, y que la transformó de un alimento primitivo a un cultivo industrial. El segundo acontecimiento fue el cruzamiento de *Saccharum officinarum* con tipos silvestres de *Saccharum spontaneum*, dando origen a las cañas del norte de la India; estos híbridos permitieron extender el cultivo de la caña de azúcar a las regiones subtropicales. Por este proceso de hibridación se obtienen plantas superiores en producción y resistencia, incrementando notablemente su valor comercial.

Descripción botánica.

La caña de azúcar es una planta herbácea que llega a medir 4 m o más de altura, con un tallo central del cual brotan tallos secundarios (a partir de la yemas de los entrenudos) y de éstos, terciarios, formando una macolla; los tallos son sólidos y actúan como órganos de reserva, están constituidos por nudos y entrenudos; los nudos son tabiques de separación formados por fibras más externas; los entrenudos generalmente son cilíndricos, lisos o con grietas longitudinales y con un surco vertical, corto en la parte inferior, en cuya base está la yema, la longitud y el número de los entrenudos es muy variable; la coloración superficial varía entre el blanco, amarillo, verde, rojo y púrpura, con distribución uniforme o con bandas longitudinales. Las hojas están compuestas de vaina, cuello y lámina. La vaina es cilíndrica y abierta hasta la base, termina hacia los lados en prolongaciones cortas, triangulares, de ápice redondeado, llamadas aurículas. El cuello de la hoja forma la unión entre la vaina y la lámina, en la línea interna de unión se localiza la lígula, una estructura membranosa, transparente, que se divide en fragmentos irregulares. La lámina delgada, paralelinervia, con un nervio central fuerte, en la base enseguida del cuello, presenta dos áreas triangulares a ambos lados del nervio central, estas áreas son más transparentes y

delgadas que el resto y su forma es una característica distintiva de cada cultivar. Las hojas son verdes en diferentes tonos, purpúreas o con bandas de diferentes colores.

La inflorescencia es una panícula, lo más llamativa de ésta son los pelos largos y sedosos que salen de la base de las espiguillas, éstas últimas se insertan en pares en las ramillas (primarias, secundarias, terciarias); una espiguilla es sésil, la otra lleva un pedicelo corto. Es frecuente la carencia de polen fértil o el desarrollo defectuoso del gineceo y en consecuencia se impide la formación normal de frutos (la forma común de propagación es la vegetativa). El fruto o cariopsis cuando se desarrolla es muy pequeño, de 2-3mm de largo, elipsoidal y amarillento (INEGI, 1991).

En México, el cultivo de caña de azúcar ocupa el cuarto lugar en importancia económica, después del maíz, frijol y sorgo. La superficie sembrada es de un poco más de 600,000 hectáreas, con una producción de casi 45,000,000 de toneladas al año (Tabla 4). La zafra del período 2000-2001 produjo 4,923,000 de toneladas de azúcar y se molieron 44,977,000 de toneladas de caña (Quintero-Ramírez, 2001).

Diatraea saccharalis.

La caña de azúcar es atacada por diversas plagas, y entre ellas *Diatraea saccharalis*, el barrenador de la caña de azúcar, es una de las plagas más importantes de esta gramínea. No hay duda alguna de que cuando Colón llegó al Nuevo Mundo ya este insecto existía en los diferentes países de América, de donde es nativo (Pérez-Labour, 1981), tales como las Antillas, América Central y Sudamérica (Davidson, 1992). Originalmente se alimentaba exclusivamente de las gramíneas silvestres, pero al introducir y sembrar la caña, prefirió a esta nueva y dulce gramínea como planta hospedera favorita (Pérez-Labour, 1981). Algunas otras plantas hospederas que con frecuencia son dañadas gravemente, son el maíz, sorgo, arroz y algunos pastos silvestres. El daño se debe a que las larvas cavan galerías dentro de los tallos, lo que reduce el crecimiento y debilita la planta, hasta el punto en que algunas pueden quebrarse o morir, especialmente con vientos fuertes. Básicamente el daño a la caña de azúcar causado por *D. saccharalis* se caracteriza por el corazón muerto en las plantas jóvenes, punta muerta en las plantas más viejas, tallos rotos, pérdida de peso en azúcar y daño a la caña que se utiliza para semillas (Davidson, 1992).

Tabla 4. Datos obtenidos de la industria azucarera en México en 1998*

Superficie sembrada	632,506 hectáreas
Café molido	47,353,042 toneladas
Bagazo obtenido	14,071,854 toneladas
Azúcar producida	5,174,027 toneladas
Mieles a 85° Brix	1,810,307 toneladas
Alcohol producido	53,125,921 litros
Jugo mezclado	44,793,516 toneladas

* Quintero-Ramírez, 2001.

Los barrenadores de la caña de azúcar invernan como larvas en las galerías de la planta hospedante. Las larvas completamente desarrolladas tienen unos 25 mm de longitud y son de color amarillo pálido a blanco con manchas color castaño, aunque en el invierno estas manchas están casi ausentes y el color amarillo es más intenso. Cuando la temperatura aumenta en la primavera se vuelven activas y extienden sus galerías hacia la superficie de la planta hasta que la cubierta de tejido restante es muy delgada. Las larvas pasan por 6 ó 7 instares y barrenan verticalmente los tallos, después de 20 a 30 días de alimentación se completa el desarrollo de las larvas y sigue la pupación. Las pupas miden aproximadamente 18mm y tienen numerosas proyecciones o pelo en el área abdominal. Los adultos emergen entre 7 y 9 días después. Las palomillas son de color paja, tienen una envergadura de 25mm, sus alas están marcadas con puntos negros y tienen un arreglo en "V", emergen del interior de los tallos. Tras aparearse las hembras, depositan sus huevos sobre las hojas de las plantas. Estos huevos están cubiertos, son de color crema, ovales y aplanados, se encuentran en filas o en racimos con un promedio de 25 ó más por masa. La eclosión ocurre en 4 a 9 días. Las diminutas larvas se alimentan al principio de las hojas o del verticilo y después barrenan en los tallos. Al final de 20 a 30 días se completa el desarrollo de las larvas, después sigue la pupación y prosigue la siguiente generación. Existen 4 ó 5 generaciones al año en zonas templadas. En el campo, el ciclo de vida dura de 30 a 45 días. Pocos barrenadores logran pasar el invierno si prevalecen condiciones de baja temperatura y lluvias copiosas, las cuales afectan a los barrenadores durante el período de eclosión. Las heladas tardías y los períodos prolongados de clima seco también afectan a los barrenadores (Davidson, 1992; Legaspi *et al.*, 1984).

Existen varias especies de *Diatraea*, entre ellas se encuentran: *D. grandiosella* (Dyar) que es el barrenador sudoccidental del maíz, este insecto es nativo de México, pero se ha dispersado a los estados del Cinturón del Maíz en Estados Unidos, *D. crambidoides* (Grote) es el barrenador del tallo del maíz del sur y también ataca al sorgo y otros pastos relacionados, *D. considerata* (Heinr) se localiza en México (Sinaloa y Las Huastecas), *D. saccharalis* (F.) es nativo de las Antillas, América Central y Sudamérica y es la plaga principal de la caña de azúcar (Davidson, 1992). La distribución de las especies de *Diatraea* que se encuentra en México se muestra en la Fig 1.

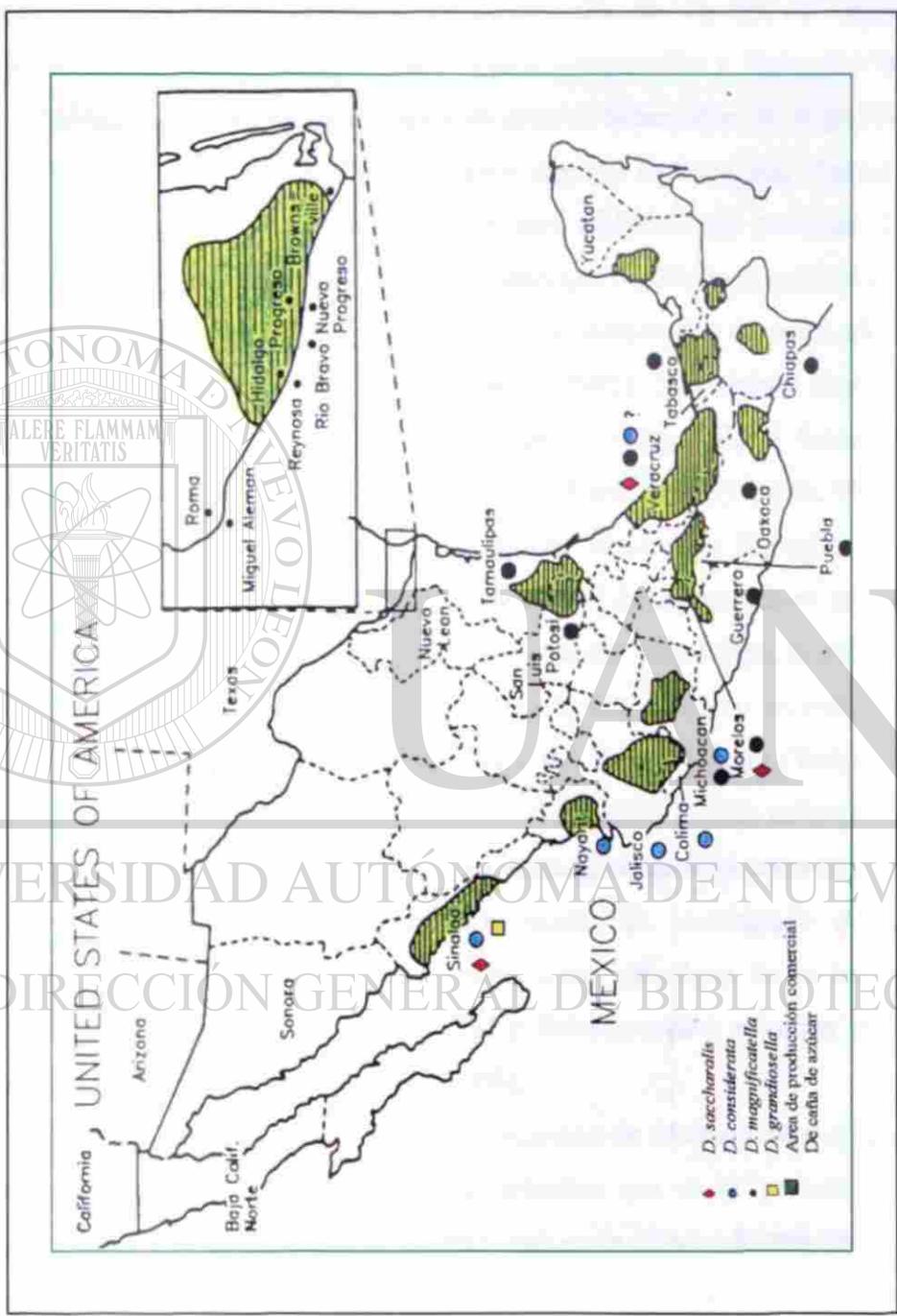


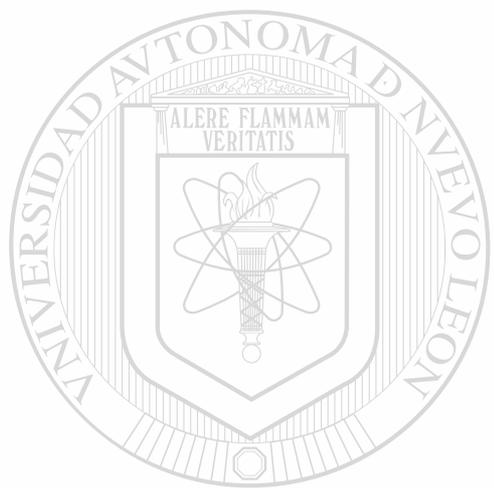
Fig. 1. Localización geográfica de diversas especies de *Diatraea* en México y el Valle de Texas en áreas de producción cañera.

Los reportes encontrados hasta la fecha indican que las plagas de *Diatraea* sp. son combatidas con químicos o bien con control biológico utilizando parasitoides. El parasitismo se define como el número de hospederos que producen progenie del parásito o el número total de hospederos atacados. La introducción de este tipo de control involucra una serie de eventos independientes que incluyen colonización y dispersión en un nuevo hábitat y hallazgo y utilización del hospedero para el incremento de la población de los parásitos (Wiedenmann y Smith, 1993). Existen algunos factores que afectan el nivel de control alcanzado por los parasitoides como son: densidad del parásito, densidad del hospedero, área de búsqueda, presencia de químicos que modifican la conducta, métodos de liberación o dispersión, calidad del parásito, uso de insecticidas en o los alrededores del área de liberación y especies parásitas (Mertz *et al.*, 1995). Un requisito importante para la colonización en el campo es la determinación de la compatibilidad fisiológica entre el hospedero y el enemigo natural de nueva asociación (Wiedenmann y Smith, 1995).

Cotesia flavipes, himenóptero de la familia Braconidae (Meagher *et al.*, 1998), (Wiedenmann y Smith, 1995), ha sido producido a nivel de laboratorio en pequeña escala y utilizan del tercer al sexto instar de *D. saccharalis* como hospederos, la encapsulación del parásito y la muerte del hospedero es causada por la asociación no co-evolucionada entre un parásito del Viejo Continente y un hospedero del Nuevo Mundo (Weidenmann *et al.*, 1992). *Cotesia chilonis* (Wiedenman y Smith, 1995) también ha sido utilizado en el control de esta plaga, otros himenópteros de la familia Trichogrammatidae como es *Trichogramma pretosium* se utiliza actualmente en México contra *D. saccharalis* (Canale, 1998), *Trichogramma brassicae* se ha utilizado contra otros miembros de la familia Pyralidae como *Ostrinia nubilalis* (Mertz *et al.*, 1995) y *Trichogramma minutum* se usan contra lepidópteros en general en frutales (Canale, 1998).

Se ha observado parasitismo en *D. crambidoides* de *Macrocentrus cingulum*, el cual es un himenóptero de la familia Braconidae, mientras que en *D. grandiosella* no se ha observado ningún tipo de parasitismo, en este caso se ha observado más bien que aislados de *Bacillus*, *Beauveria*, *Enterococcus*, *Nosema*, *Pseudomonas* y *Serratia* han sido patogénicos a *D. grandiosella* bajo condiciones ambientales controladas y con la excepción de *B. bassiana*, el cual ya se ha formulado contra *D. saccharalis* (Sánchez *et al.*, 1992)

todos éstos son patógenos nuevos para las especies de *Diatraea* (Inglis *et al.*, 2000). Otra de las alternativas más viables al uso de insecticidas para el control de esta plaga, es el uso de plantas resistentes. Para *D. grandiosella* y *D. saccharalis* se han probado líneas experimentales de maíz, derivadas de un programa de retrocruzamiento. La base química de este maíz resistente se ha identificado como Maysina, que es una C-glucosil flavona y compuestos relacionados (ácido clorogénico, apimaysina y 3'-metoximaysina) que confiere resistencia mediante la inhibición del crecimiento larval (Abel *et al.*, 2000).



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MATERIALES Y MÉTODOS

Implementación de la Cría de *D. saccharalis*.

La cría de *D. saccharalis* fue establecida utilizando la misma dieta artificial reportada para *Trichoplusia ni* (Shorey, 1963), con algunas modificaciones en los ingredientes que consistieron en la adición de 18 g más de azúcar y 12.5 g más de agar. Debido a la larga duración del ciclo larvario, fue necesaria la transferencia a dieta fresca a partir de la mitad del ciclo, para el buen desarrollo de las larvas. Las pupas fueron recolectadas manualmente (Fig. 2A) y colocadas en copas de plástico dentro de cubetas tapadas con gasa, para la emergencia de los adultos (Fig. 2B). Los adultos se transfirieron a cubetas forradas con plástico en la parte interior y tapadas con gasa (Fig. 2C). Para la alimentación de los adultos se utilizaron copas rellenas de algodón impregnado de una solución de agua con azúcar al 15%, las copas se cubrieron completamente con plástico y se les hicieron 4 perforaciones en la parte superior, de las cuales se extrajeron porciones de algodón para que los adultos se alimentaran (Fig. 2D). Las hembras ovipositaron sobre el plástico de la cubeta o de la copa, facilitando de esta manera el desprendimiento de los huevecillos. El plástico se raspó suavemente con una espátula para desprender los huevecillos y se colocaron en un colador para lavarse con agua corriente durante unos 3 minutos. Una vez secos los huevecillos se colocaron en la base de una copa (Fig. 3A), la cual a su vez fue colocada en una copa con dieta y tapada hasta antes de la eclosión de las larvas con tapa de cartón, es decir, hasta la etapa de cabeza negra; posterior a la eclosión se utilizaron tapas de plástico (Fig. 3B). Las larvas neonatas se transfirieron a copas con dieta fresca, colocando de 10 a 15 larvas por copa (Fig. 3C). Para el mantenimiento de la colonia se utilizaron 400 larvas, este número se incrementó según el número de larvas necesarias para la realización de los bioensayos (Fig. 3D).

Obtención del complejo espora-cristal

Se utilizaron 12 cepas de *B. thuringiensis* HD y nativas de la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.C.B., las cuales fueron: HD-2 var. *thuringiensis*, HD-9 var. *entomocidus*, HD-29 var. *galleriae*, HD-37 var. *dendrolimus*, HD-59 var. *thuringiensis*, HD-73 var. *kurstaki*, HD-133 var. *aizawai*, HD-137 var. *aizawai*, HD-551 var. *kenya*, GM7 var. *aizawai*, GM10 var. *aizawai* y GM34 var. *kurstaki*. La

obtención del complejo espora-cristal se realizó por el método de lactosa-acetona (Dulmage, 1970).

Las cepas se activaron durante 18 h en tubos con agar inclinado a pH 7.0, se tomaron varias asadas para inocular 50 ml de caldo triptosa fostato (CTP) contenido en matraces Erlenmeyer de 250 ml, los matraces estuvieron en agitación a 200 rpm, a 30°C por 18 h. Del medio CTP se tomó 1 ml el cual se inoculó en 100 ml de medio a base de melaza (melaza 20 g/l, harina de soya 20 g/l, líquido de remojo de maíz 10 g/l y carbonato de calcio 1 g/l) a pH 7.0-7.2, en matraces Erlenmeyer de 1000 ml con agitación a 200 rpm y 30°C. Los cultivos fueron monitoreados hasta observar un 80% de esporulación, en este punto se detuvo la fermentación y se ajustó el medio a pH 7.0. Para la recuperación del complejo espora-cristal, el medio de cultivo se sometió a centrifugación a 10,000 rpm por 30 min y se determinó el peso del precipitado mediante la siguiente ecuación: $PP = P_2 - P_1$, donde P1 (peso 1) correspondió al peso del bote más el medio de cultivo, P2 (peso 2) correspondió al peso del precipitado en el bote, descartando el sobrenadante y PP (peso del precipitado) correspondió al peso del precipitado obtenido de la diferencia de los pesos. Para obtener el volumen de lactosa al 5% necesario para la coprecipitación, el PP se multiplicó por un factor de 1.71 y al volumen obtenido de lactosa se le sumó el PP, de esta manera se obtuvo el volumen total, esta cantidad se multiplicó por un factor de 3.34 para obtener el volumen de acetona necesario para la coprecipitación, según lo reportado por Dulmage (1970). El precipitado se colocó en un vaso de precipitado con los volúmenes de lactosa y acetona en agitación durante 30 min, posteriormente se dejó reposar por 10 min. Toda la mezcla se filtró en un matraz Kitasato utilizando papel Whatman #1, el precipitado se lavó con 3 volúmenes de acetona. El filtrado se dejó secar y se molió finamente con un mortero y se guardó en frascos herméticos hasta su utilización.

Bioensayos de toxicidad contra larvas de *D. saccharalis*.

El complejo espora-cristal (extracto) obtenido de cada una de las cepas, se utilizó en bioensayos de toxicidad contra larvas de dos días de edad de *D. saccharalis*. Las dosis utilizadas fueron de 50 y 500 µg del extracto de *B. thuringiensis* por ml de dieta. Con el extracto se preparó una solución stock utilizando 250 mg aforados a 50ml de agua destilada para obtener una solución con una concentración de 5000 µg/ml. De esta solución se tomaron 12.5 ml los cuales se incorporaron a 112.5 ml de dieta para obtener la

concentración de 500 µg/ml de dieta y 1.25 ml + 11.25 ml de agua destilada se incorporaron a 112.5ml de dieta para obtener la concentración de 50µg/ml de dieta. Por cada copa del número cero con dieta artificial para cada dosis, se transfirió una larva de dos días de edad, cerradas con tapa de plástico y colocadas en bolsas de papel, se incubaron a 28°C y 65 ± 5% de H.R. Se probaron un total de 75 larvas para cada dosis y extracto de *B. thuringiensis*. Como controles se utilizaron copas con dieta sin extracto de *B. thuringiensis*. La mortalidad se registró a los 7 días. Se seleccionaron aquellas cepas que presentaron una actividad tóxica arriba del 50% con la dosis de 50µg/ml.

Detección de genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* y *cryIC* de las cepas de *Bacillus thuringiensis* mediante análisis de PCR e inmunodetección de proteínas Cry.

Se utilizaron las cepas de *B. thuringiensis*, que resultaron tóxicas contra *D. saccharalis* y dos cepas adicionales como controles, estas cepas se mantuvieron en agar nutritivo hasta su utilización

La identificación de los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIB* y *cryIC* fue realizada utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo a lo reportado por Cerón y col. (1994).

Las cepas de *B. thuringiensis* se dejaron crecer por 12 h en agar nutritivo, posteriormente una colonia se transfirió a 0.1 ml de agua mQ estéril en un tubo eppendorf de 600 µl de capacidad, la suspensión fue agitada y colocada en un baño de agua por 10 min para lisar a las células. El lisado resultante se centrifugó brevemente (10,000 rpm, 10 s) para, posteriormente tomar la muestra conteniendo el DNA. A un tubo de reacción de PCR de 200 µl se agregaron 5 µl del buffer de reacción + Mg²⁺, 1 µl de cada uno de los iniciadores (primers) y 2 µl en total de los cuatro desoxinucleótidos trifosfato 2.5 mM, la muestra de DNA se agregó en cantidad suficiente para completar un volumen de 49.5 µl, está mezcla se calentó a 94°C por 2 minutos, posteriormente se agregaron 0.5 µl de la enzima *Taq* DNA polimerasa de 5U/µl, para tener un volumen total de 50 µl. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR (Modelo System 2400) con un programa de 25 ciclos, con un paso inicial de 94°C por 5 min y un ciclo constante de desnaturalización a 94°C por 2 min, anillamiento a 55°C por 2 min, y una extensión a 72°C por 2 min y un paso de extensión adicional a 72°C por 7 min. Se utilizó una cepa control para probar los juegos de iniciadores (primers). Los productos de la

amplificación se sometieron a un análisis electroforético utilizando gel de agarosa al 3% en buffer TAE 1X. De 10 a 13 μ l de los productos de amplificación se mezclaron con 2 μ l de una mezcla de azul de bromofenol y xilencianol y se colocaron en el gel. La electroforesis se corrió a 100V por 45 min. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio por 2 a 5 min y revelados con luz ultravioleta. Las fotografías se tomaron con una cámara Fisher-Biotech FB-PDC-34.

La inmunodetección se realizó de la siguiente manera: Las cepas se inocularon en cajas petri con agar CCY e incubaron a 20°C hasta la esporulación (3-4 días). Una vez comprobada la producción de los cristales característicos, el cultivo se lavó y pasteurizó a 70°C por 30 min. La mezcla de esporas-cristales se lavó a 7000 Xg con NaCl 1M. El precipitado se lavó dos veces con una solución de NaCl 1M y EDTA 5 mM frío. Para la solubilización y activación de las toxinas se resuspendió el precipitado en un buffer de carbonatos (Na_2CO_3 50 mM; NaCl 0.1M; DDT 10 mM) pH 11.5 durante 2 h en agitación constante a temperatura ambiente. Se centrifugó a 14,000 Xg y se decantó para obtener el sobrenadante. Al sobrenadante se le determinó la concentración de proteínas. El producto de la digestión fue observado en geles de poliacrilamida-SDS al 10%. El producto de la reacción se almacenó para su uso posterior.

Las toxinas de las diferentes cepas se sometieron a ensayos de inmunodetección para saber el tipo de toxina que sintetiza cada una. Se utilizaron los antisueros antiCryIAc, que reconoce CryIAa, CryIAb, CryIAc y el antiCryIB. El proceso se realizó de acuerdo a lo reportado por Iracheta (1999).

Determinación de la CL_{50} y TL_{50}

Las cepas que presentaron una actividad tóxica arriba del 50% con la dosis de 50 μ g/ml se sometieron a un nuevo bioensayo utilizando 8 concentraciones para determinar la concentración letal media. Las concentraciones utilizadas fueron: 10, 15, 20, 25, 35, 55, 65, y 100 μ g/ml y los bioensayos se realizaron de la manera antes mencionada, los resultados obtenidos se sometieron al método estadístico Probit. En los bioensayos de toxicidad con las dosis de 50 y 500 μ g/ml, la mortalidad se registró diariamente durante 7 días para determinar el tiempo letal medio.

Propagación de la cepa efectiva y obtención del extracto a nivel de fermentador.

La cepa seleccionada como más efectiva fue propagada en 6 biorreactores New Brunswick Sc. Co. de 14 litros de capacidad con 10 litros de medio a base de melaza. Los parámetros de fermentación que se utilizaron fueron: 1% inóculo, temperatura de 30°C, pH 7.0, 1vvm de aereación y una agitación de 500 rpm (Galán-Wong, 1993). La adición de HCl al 10% o de NaOH al 10% para regular el pH, así como el antiespumante al 20%, se realizó manualmente. Las fermentaciones tuvieron una duración aproximada de 34 horas cada una. La observación microscópica del cultivo hasta llegar a la fase de esporulación del 80% se realizó cada 4 horas y a partir de las 24 h se realizó cada hora. El extracto se obtuvo por el método de lactosa-acetona (Dulmage, 1970).

Elaboración de formulados granulares para bioensayos de preferencia alimenticia

Los formulados granulares se elaboraron a base de Capsul® (almidón de maíz modificado) gelatina bovina y pectina de limón. Los fagoestimulantes utilizados fueron Coax® (fagoestimulante comercial), azúcar (sacarosa) y caña de azúcar en polvo (Fig 4A). La caña de azúcar se deshidrató en un horno de tiro forzado a 50°C por 3 días y después se molió en un molino de perlas durante 24 h para obtenerla como polvo fino. En total se hicieron 12 tipos de gránulos. Los formulados a base de Capsul® se elaboraron mezclando 50 g del polímero con y sin fagoestimulante al 4% + 25ml de agua destilada (por cada 50g de polímero), los formulados de Capsul®-gelatina y Capsul®-pectina se elaboraron mezclando los polímeros a razón de 1:1 con y sin fagoestimulante al 4% + 25 ml de agua destilada (por cada 50 g de polímeros), todas las mezclas se incorporaron con una espátula hasta la apariencia de sólido con forma de miga, las mezclas que contenían Capsul® como único polímero permanecieron en forma de pasta húmeda. Las mezclas (excepto las de Capsul®) se pasaron a través de una criba con malla número 6 para eliminar las partículas más grandes y hacer uniforme el tamaño de los gránulos, se colocaron en moldes de aluminio recubiertos con papel encerado y se desecaron en un horno de tiro forzado a una temperatura de 40 a 45°C por 24 h. Una vez desecadas, las mezclas de Capsul® se molieron con un mortero, mientras que el resto de las mezclas se desmoronaron manualmente (Figs. 4B, C, y D). Los gránulos obtenidos se almacenaron en botes de

plástico herméticos a temperatura ambiente para su uso posterior. La Tabla 5 muestra los soportes obtenidos de la combinación de polímeros y fagoestimulantes.

Bioensayos de preferencia alimenticia.

Los bioensayos de preferencia alimenticia se realizaron para determinar el polímero y el fagoestimulante más aceptados por *D. saccharalis*. El bioensayo de preferencia alimenticia se realizó por el método de dos alternativas descrito por Bartelt y col. (1990), para el cual se elaboraron formulados granulares sin extracto de *B. thuringiensis*.

Para el bioensayo se utilizaron cajas de petri desechables de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una mezcla de pasta de París y carbón activado en proporción 15:1. En cada caja se depositaron en sitios opuestos 0.2 g de gránulos a comparar. Un total de 66 pares de gránulos se compararon (Fig. 5). Como control se utilizaron trozos de 0.2g de caña de azúcar fresca (*Saccharum officinarum*) los cuales se enfrentaron contra todos los gránulos. Se realizaron 5 repeticiones para cada comparación. En cada repetición se transfirieron 10 larvas de dos días de edad de *D. saccharalis* a las cuales se les permitió alimentarse durante 16 h a 28°C. en completa oscuridad. Al término de este período las cajas de petri se congelaron a -30°C y el número de larvas sobre cada sitio se registró. Los resultados fueron analizados por ANOVA y prueba de Tukey para comparación de medias con una $P \leq 0.05$.

Elaboración de los formulados granulares y asperjables a base de *B. thuringiensis* para bioensayos de laboratorio

Según los resultados obtenidos en los bioensayos de preferencia alimenticia se desarrollaron formulados granulares y asperjables con el polímero y el fagoestimulante más aceptado por *D. saccharalis*. usando *B. thuringiensis* al 3, 7, 10% para pruebas de laboratorio. Para la elaboración de los formulados granulares se siguió la misma metodología que se utilizó para la elaboración de los formulados granulares en los bioensayos de preferencia alimenticia, considerando en este caso la adición de *B. thuringiensis* a las concentraciones mencionadas. Para la elaboración de los formulados asperjables se utilizó el método reportado por Luna Santillana (1998). Se hicieron las soluciones acuosas con los polímeros correspondientes, en las cuales se dispersó el fagoestimulante y el extracto de *B. thuringiensis* y se secaron utilizando un secador por aspersión. La Tabla 6 muestra las cantidades utilizadas en las formulaciones. Las

condiciones del secador por aspersión fueron: temperatura de entrada de 130-145°C, temperatura de salida de 70 a 90°C, presión de 3.4-4.4 kp/cm², resistencia de 4-6 y flujo de 7 a 12 ml/min.

Determinación de la actividad tóxica de las formulaciones contra *D. saccharalis* a nivel de laboratorio.

Una vez obtenidos los formulados, se realizaron bioensayos en laboratorio para determinar la retención de la actividad tóxica de *B. thuringiensis*. Para los formulados granulares se utilizó el método reportado por Dunkle y Shasha (1988), para ello se utilizaron cajas de petri desechables de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una capa de pasta de París y carbón activado, se colocaron en el centro 0.2 g del formulado dejando humedecer por espacio de 1 hora, posteriormente se colocaron 20 larvas de dos días de edad y se les permitió alimentarse sobre el formulado por 24 h. Para cada formulado se hicieron 5 repeticiones, después de las 24 horas de exposición a los formulados, se determinó el porcentaje de mortalidad y se seleccionaron 5 larvas sobrevivientes de cada caja (25 en total para cada formulado) las cuales se transfirieron a copas individuales conteniendo dieta artificial, se determinó la mortalidad a los 7 días. Los formulados asperjables fueron reconstituídos en agua estéril para incorporarse a la dieta artificial de *D. saccharalis* ajustando las 3 concentraciones de los formulados a la dosis 50 µg/ml. El bioensayo fue realizado siguiendo la metodología antes descrita para los bioensayos de toxicidad de los extractos de *B. thuringiensis*.

Microscopía electrónica de barrido.

Los formulados granulares y asperjables, así como los cristales y esporas de las 5 cepas tóxicas fueron fotografiados de la siguiente manera: Se utilizaron bases cilíndricas de aluminio, con un cubreobjetos cortado a la medida, en su superficie. Las muestras ahí colocadas se recubrieron con oro en un recubridor iónico de capa fina. La observación fue realizada en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-35C y se utilizó una película Polaroid Polapan Pro100 54. Las muestras fueron sometidas a este proceso para determinar su forma y tamaño y en el caso de los formulados, la textura y encapsulamiento.

Pruebas de Campo

Las pruebas de campo se realizaron en una parcela con cultivo de caña de azúcar *Saccharum officinarum*, variedad MEX-801410, ubicada en la localidad de La Escalera, municipio de Ameca, Jalisco, la cual se encuentra a 1,300 msnm. El experimento se realizó durante los meses de mayo a agosto de 2001, para evaluar la efectividad biológica de las formulaciones a base de la cepa GM34 de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki*.

La unidad experimental estuvo constituida por 10 surcos de 12 m con 1.2 m de distancia entre surcos. El área total por tratamiento fue de 672 m² y el experimento tuvo un área total de 6,720 m². Los tratamientos aplicados se muestran en la Tabla 7.

Muestreo para la selección del área del experimento

Se tomó una muestra de 25 cañas individuales en un lote de 1 ha, tomando de cada 10 surcos una muestra de 6 cañas al azar, eliminando los efectos de orilla. Este muestreo se realizó en lotes que ya presentaban los canutos formados. Si las cañas tenían ya formada la sección 8-10, se cortaba la planta completa y si era menor de 9 meses, se cortaba la parte superior a la mitad del tallo.

Las muestras obtenidas fueron revisadas cuidadosamente, para buscar larvas recién eclosionadas presentes en las hojas jóvenes o en la inserción de éstas con el tallo. También se buscaron señales de daño reciente (lesiones frescas o heces que implicaran la presencia de larvas), perforaciones recientes. Con cualquiera de éstos indicadores de la presencia de larvas penetrantes fue considerada esa caña como infestada. El índice de infestación se obtuvo registrando el total de la muestra como el 100%. La localidad donde el índice de infestación fue del 20% o mayor, se consideró adecuada para realizar las aplicaciones.

Momento de la aplicación.

Las aplicaciones de las dosis insecticidas fueron realizadas cuando la población de barrenadores se encontró en estado de "larva penetrante", esto es, en primer y segundo instar, antes de que penetre los tallos. La cantidad de aplicaciones fue dependiente del número de generaciones evaluadas en el experimento. Los formulados asperjables fueron aplicados al follaje con aspersora de líquidos y los formulados granulares fueron aplicados con saleros, según la dosis correspondiente a cada unidad experimental (Fig. 6). Los tratamientos se sortearon en las parcelas y todas las aplicaciones se realizaron según el croquis obtenido (Fig. 7). El área donde fue establecido el experimento fue seleccionado en

función de la cantidad de larvas obtenidas en los muestreos. Se obtuvo información de la densidad de población plaga en el cultivo antes del establecimiento del experimento.

Muestreo y tamaño de muestra.

El muestreo para determinar el nivel de infestación inicial de larvas fue realizado sin periodicidad fija en diversas localidades y sirvió para conocer las condiciones de infestación larval mas uniforme para el establecimiento del experimento. Una vez que fue establecido el experimento y aplicados los tratamientos, se realizaron muestreos para evaluar el efecto de las dosis de *B. thuringiensis* en la densidad poblacional de larvas. La aplicación fue realizada cuando la población de larvas se encontró como "larva penetrante" esto es, en el exterior del tallo.

El tamaño de muestra utilizado para los muestreos de daño y de larvas se definió de acuerdo a los resultados del muestreo para determinar el nivel inicial de infestación de plaga antes de la aplicación y también por los resultados del primer muestreo después de la aplicación de los tratamientos. Se buscó dentro de cada unidad experimental síntomas externos de daño provocado por barrenadores en los tallos. Los tallos dañados de cada unidad experimental fueron partidos en forma longitudinal y se observaron los daños.

Como parámetros de medición fueron cuantificados para este estudio los siguientes aspectos: fitotoxicidad al cultivo, cuantificación de poblaciones plaga de barrenadores, cuantificación del daño en tallo y follaje y cuantificación de la fenología de la planta

Evaluación de la fitotoxicidad al cultivo.

La fitotoxicidad fue evaluada de acuerdo al número de plantas sanas y con síntomas de daño, emergidas en toda la población de cada unidad experimental, al 1° y al 5° día después de la aplicación del bioinsecticida. Para determinar el grado de fitotoxicidad, se aplicó la escala de puntuación propuesta por la European Weed Research Society (EWRS) (Tabla 8). Para indicar que no existe efecto fitotóxico al cultivo, se consideró un valor de aceptabilidad máximo de 4. Esto es, de ocurrir un valor de aceptabilidad mayor a 4.0, se concluirá que el producto es fitotóxico al cultivo.

Evaluación de las poblaciones de barrenadores.

El tamaño de muestra consistió en revisar todos los tallos con síntoma de daño por barrenadores en 5 cepas dentro de cada unidad experimental. Los tallos muestreados en cada unidad experimental fueron disectados longitudinalmente y se cuantificaron las larvas

encontradas por especie a nivel de tallo y de entrenudo, los registros de poblaciones fueron tomados a los 5, 38 y 64 días después de la aplicación de los tratamientos.

Evaluación del daño ocasionado por los barrenadores.

En cada una de las unidades experimentales, fueron cuantificadas las cepas que contenían tallos cosechables dañados por barrenadores, esto es, el “corazón muerto”. Se tomaron tallos (uno por cepa) en plantas con competencia completa, que fueran típicas de la parcela experimental.

Para evaluar los daños en cada unidad experimental del experimento, fueron realizados muestreos 2 horas antes de la aplicación de los tratamientos y a los 5, 38 y 64 días de la aplicación y se evaluó el número de cepas con tallos dañados. A las cañas muestreadas se les realizó un corte longitudinal para apreciar con precisión los camutos dañados tanto por la mordedura directa de la larva, así como por la coloración roja que produce la toxina del muermo rojo *Physalospira tucumanensis*, siempre que ésta sea producida por el daño del barrenador. (Fig. 8).

Registro de la fenología de la planta.

Durante el período del experimento, se cuantificó el desarrollo fenológico del cultivo en relación a: altura de planta y número de tallos cosechables.

Análisis estadístico

Para analizar estadísticamente los resultados se utilizó un diseño de bloques completos al azar. Cada tratamiento fue repetido 4 veces. La información obtenida fue sometida a un análisis de varianza para detectar diferencias debidas a los tratamientos. Cuando el análisis detectó diferencias significativas se utilizó la técnica de contrastes ortogonales para diferenciar efectos de los tratamientos y grupos de tratamientos (Tabla 9).

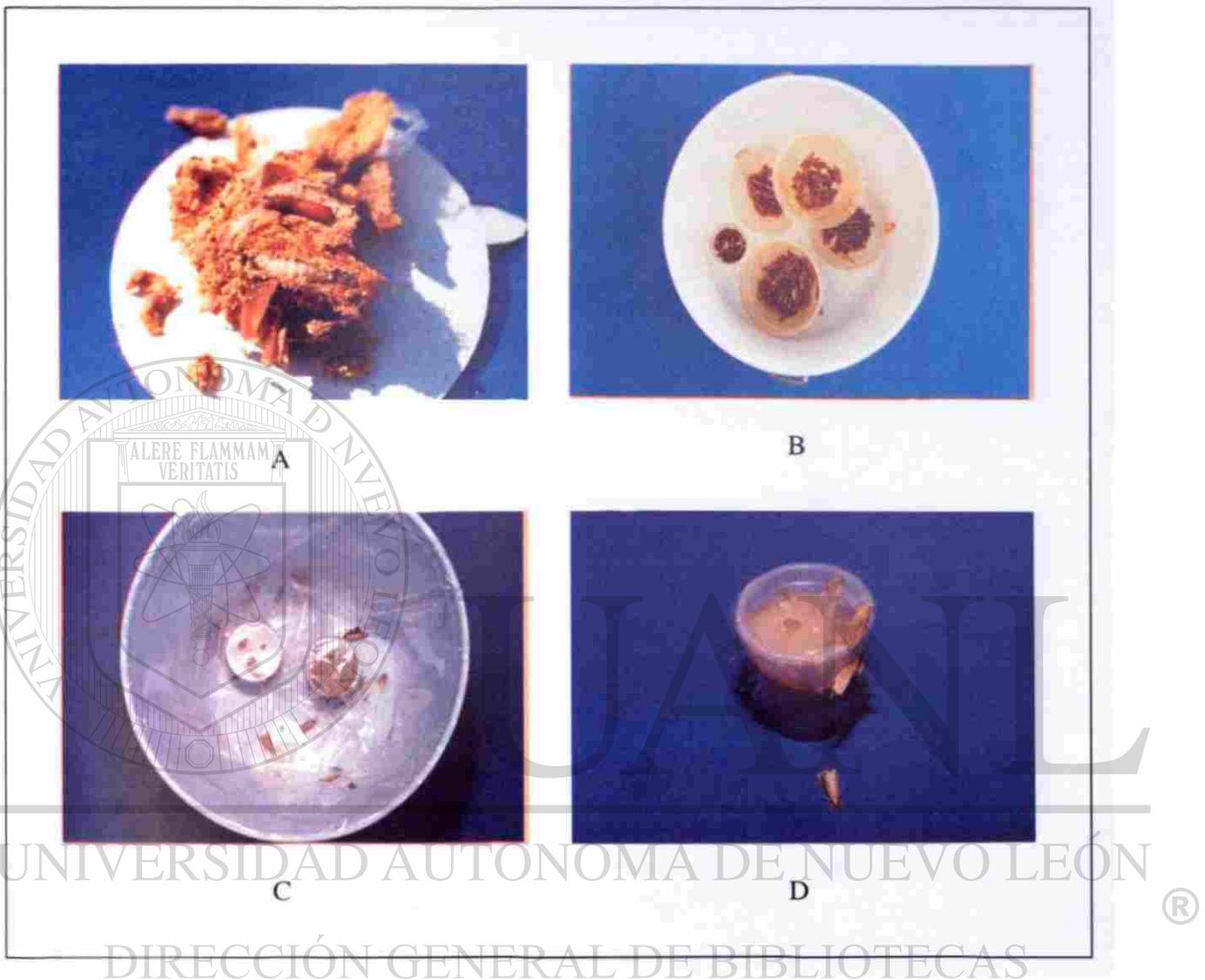


Fig 2. Proceso de cría artificial masiva de *Diatraea saccharalis*.

A) recolección manual de pupas de *Diatraea saccharalis*, B) mantenimiento de las pupas hasta la emergencia de los adultos, C) transferencia y mantenimiento de los adultos, D) copa de alimentación con solución de azúcar para los adultos.

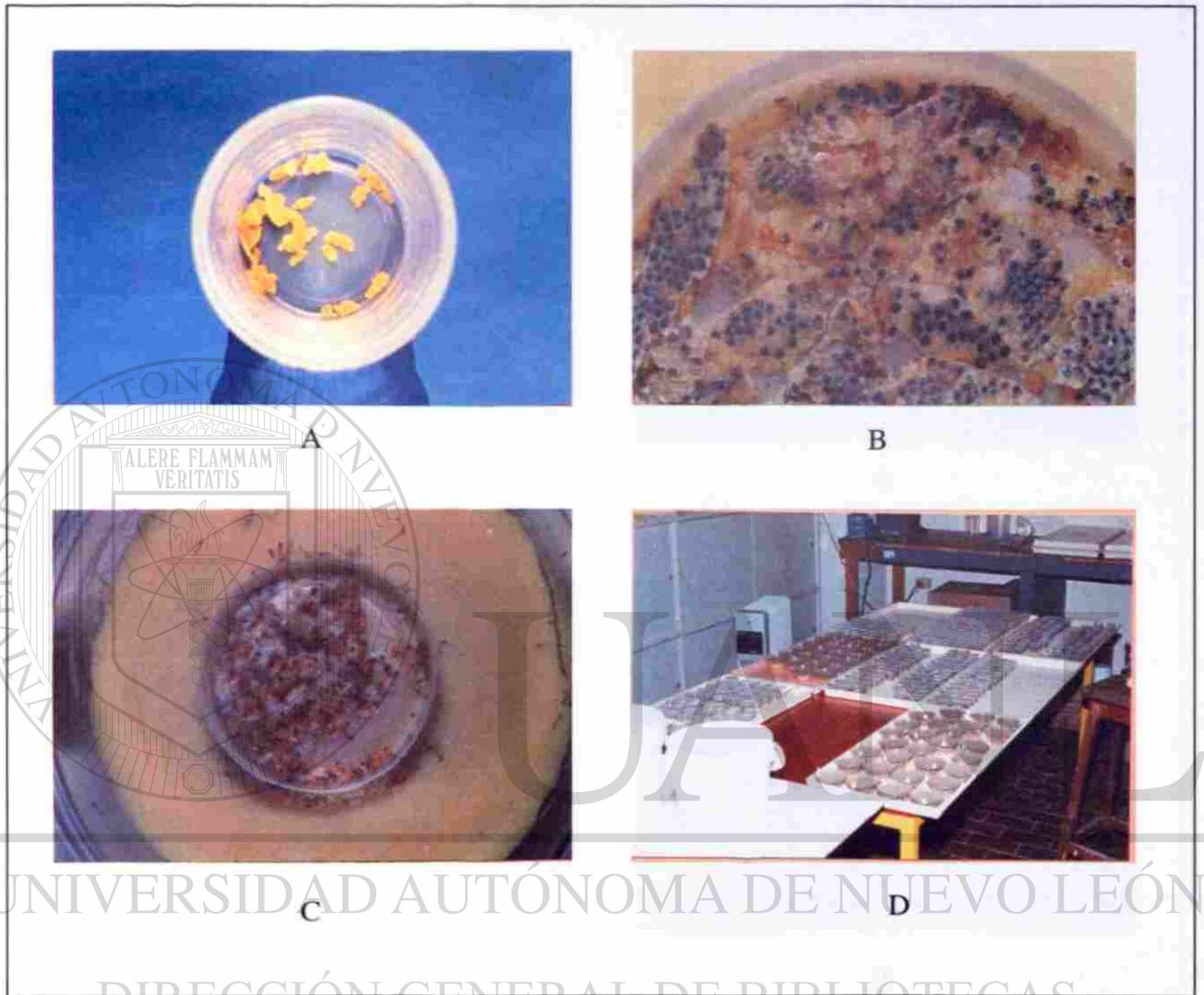


Fig. 3. Proceso de cría artificial masiva de *Diatraea saccharalis*.

A) masas de huevecillos recolectados mediante raspadura, B) masas de huevecillos en estado de cabeza negra, C) eclosión de huevecillos y larvas neonatas alimentándose a partir de la dieta, D) cría masiva de *Diatraea saccharalis*.

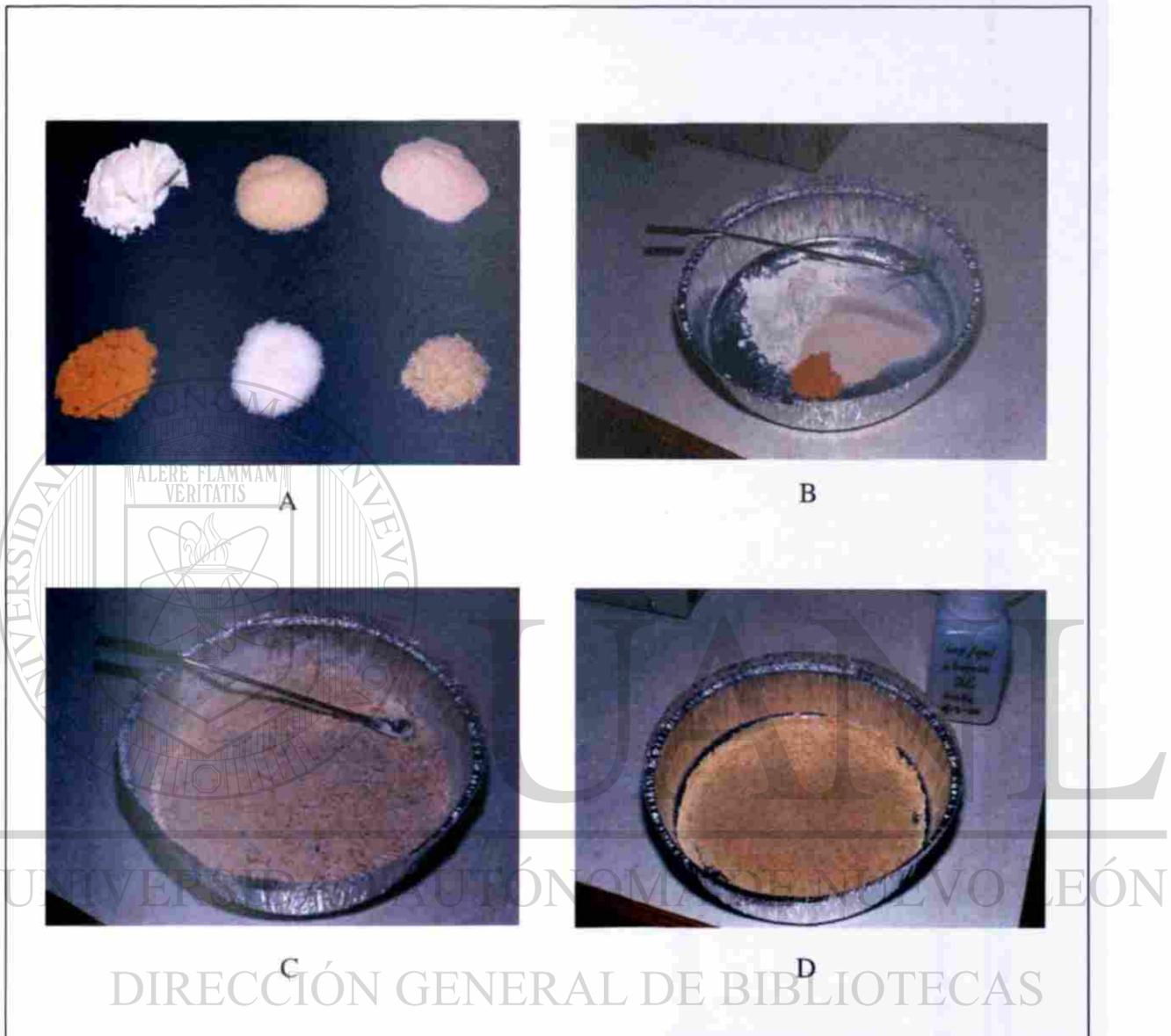


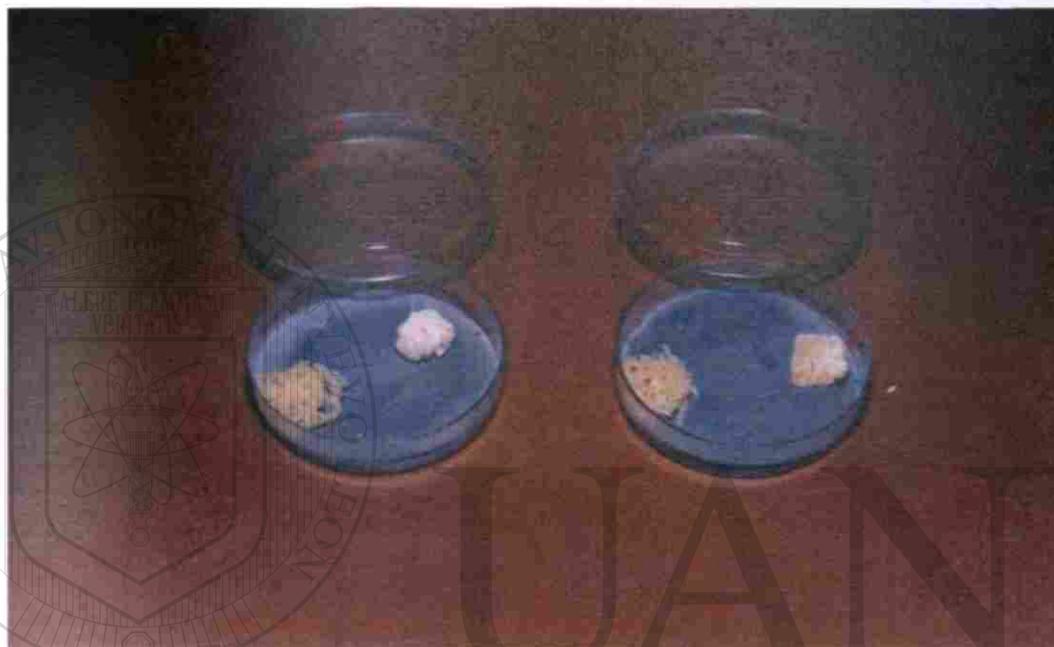
Fig. 4. Elaboración de formulados granulares.

A) de izquierda a derecha y de arriba a abajo, polímeros de gelatina, pectina y capsul, fagoestimulantes, coax, azúcar y caña de azúcar deshidratada, B) mezcla de ingredientes secos, C) mezcla con agua para formar un sólido con forma de miga, D) gránulos obtenidos después del secado en horno de tiro forzado.

Tabla 5. Tipos de soportes granulares obtenidos de las combinaciones de los polímeros y fagoestimulantes

Soportes	Clave
Capsul®	A
Capsul® + Coax®	A1
Capsul® + azúcar	A2
Capsul® + caña de azúcar en polvo	A3
Capsul®/gelatina	B
Capsul®/gelatina + Coax®	B1
Capsul®/gelatina + azúcar	B2
Capsul®/gelatina + caña de azúcar en polvo	B3
Capsul®/pectina	C
Capsul®/pectina + Coax®	C1
Capsul®/pectina + azúcar	C2
Capsul®/pectina + caña de azúcar en polvo	C3

En todas los soportes se usaron 25g de cada polímero, excepto para A-A3 en donde se utilizaron 50g del polímero, los fagoestimulantes se añadieron al 4%.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Fig. 5. Cajas de petri mostrando la colocación de los gránulos para la realización de los bioensayos de preferencia alimenticia.

Tabla 6. Cantidad de ingredientes utilizados para la elaboración de los formulados asperjables.

Formulados	Capsul [®]	Gelatina	Café en polvo	Extracto de B.I.
3%	264.0	15.0	12.0	9.0
7%	252.0	15.0	12.0	21.0
10%	243.0	15.0	12.0	30.0

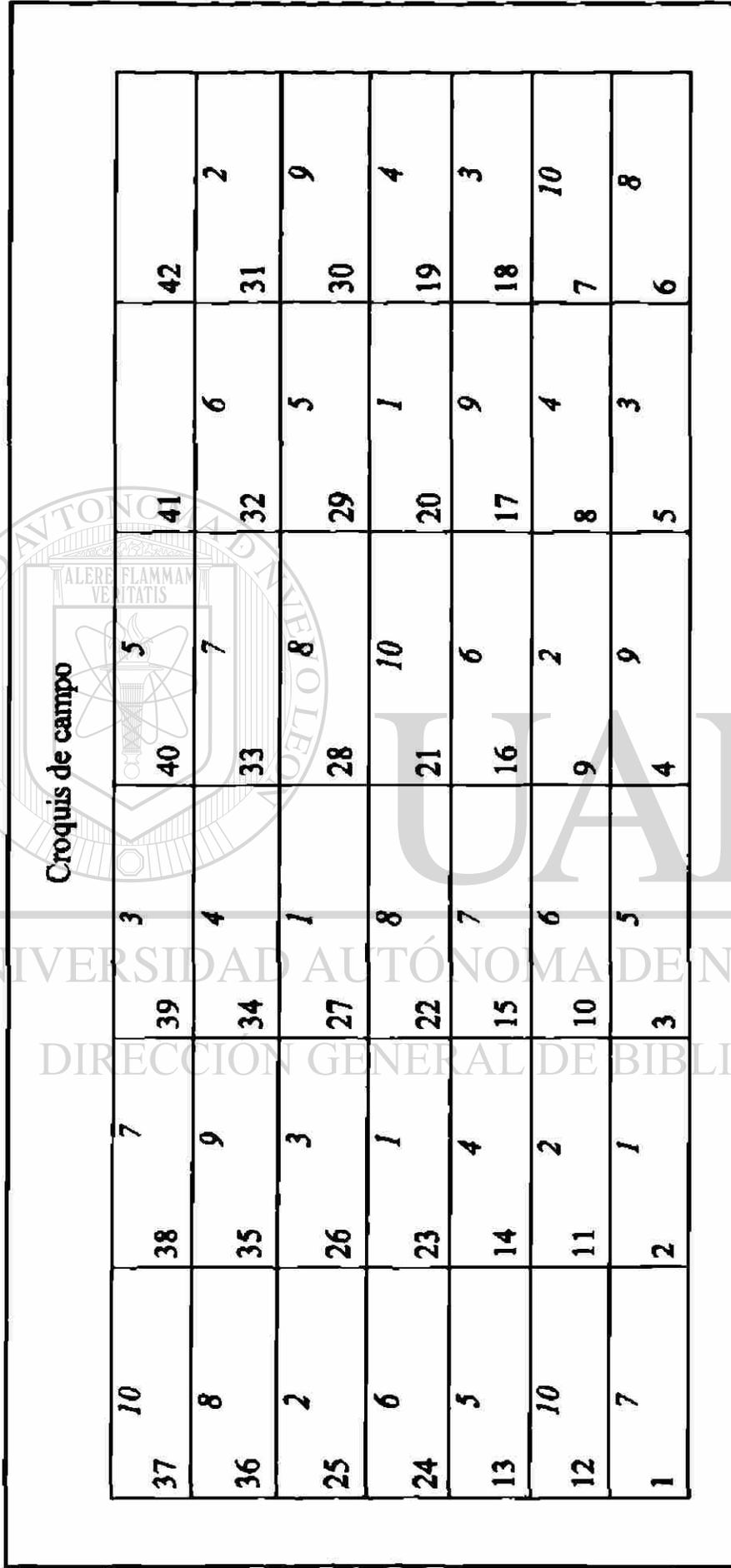
*Mezclados con agua destilada en cantidad suficiente.

Tabla 7. Orden de los tratamientos aplicados.

Número de Tratamiento	Aplicación
1	Testigo sin aplicación
2	Blanco granular
3	Blanco asperjable
4	Granular 3%
5	Granular 7%
6	Granular 10%
7	Asperjable 3%
8	Asperjable 7%
9	Asperjable 10%
10	Testigo comercial (Lepinox)



Fig. 6. Aplicación del bioinsecticida en forma asperjable y granular en cultivo de caña de azúcar. A), B) y C) aplicación con aspersora; D), E) y F) aplicación con salero.



	7	3	5	41	42
10	38	39	40	41	42
8	9	4	7	6	2
36	35	34	33	32	31
2	3	1	8	5	9
25	26	27	28	29	30
6	1	8	10	1	4
24	23	22	21	20	19
5	4	7	6	9	3
13	14	15	16	17	18
10	2	6	2	4	10
12	11	10	9	8	7
7	1	5	9	3	8
1	2	3	4	5	6

Fig 7. Croquis elaborado para realizar las pruebas de campo. Los números del 1 al 42 corresponden a la numeración de las parcelas, los números del 1 al 10 en letra cursiva corresponden a la aplicación de los tratamientos.

Tabla 8. Escala de puntuación propuesta por la European Weed Research Society para determinar el grado de fitotoxicidad.

Valor	Efecto sobre el cultivo
1	Sin efecto
2	Síntomas muy ligeros
3	Síntomas ligeros
4	Síntomas que no se reflejan en el rendimiento
5	Daño medio
6	Daños elevados
7	Daños muy elevados
8	Daños severos
9	Muerte completa



Fig. 8. Muestreo de tallos para observar daño externo causado por barrenadores y cortes longitudinales para evaluación de daño.

Tabla 9. Contrastes ortogonales en la comparación de tratamientos y grupos de tratamientos.

Contraste	Tratamientos contrastados	Descripción del contraste
C1	T1 vs T2 y T3	Testigo sin aplicación contra tratamientos blancos
C2	T1 vs T4, T5, T6, T7, T8, T9 y T10	Testigo sin aplicación contra tratamientos con base en <i>B. thuringiensis</i>
C3	T4, T5 y T6 vs T7, T8 y T9	Tratamientos granulares contra tratamientos asperjables
C4	T4 vs T5 y T6	Dosis baja de granulado contra dosis media y alta de granulado
C5	T6 vs T4 y T5	Dosis alta de granulado contra dosis media y baja de granulado
C6	T7 vs T8 y T9	Dosis baja de asperjable contra dosis media y alta de asperjable
C7	T9 vs T7 y T8	Dosis alta de asperjable contra dosis media y baja de asperjable
C8	T10 vs T4, T5 y T6	Testigo comercial contra tratamientos granulares
C9	T10 vs T7, T8 y T9	Testigo comercial contra tratamientos asperjables

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 spora-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 ($F = 1.852$, $g = 4$, $P \leq 0.05$). 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 CL_{50} (33.21 $\mu\text{g/ml}$) fue la GM34. Adicionalmente se hicieron mezclas de los complejos espóra-cristal de las cepas HD y GM con la finalidad de observar si disminuía la CL_{50} , ésta disminuyó con respecto a las CL_{50} individuales, pero no mejoró con respecto a la CL_{50} 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 los 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 µg/ml. La mortalidad causada fue similar para las tres dosis a las 24 horas, presentado 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 rebrotes 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 fue sometido a un análisis de varianza y se observa en la Tabla 16.

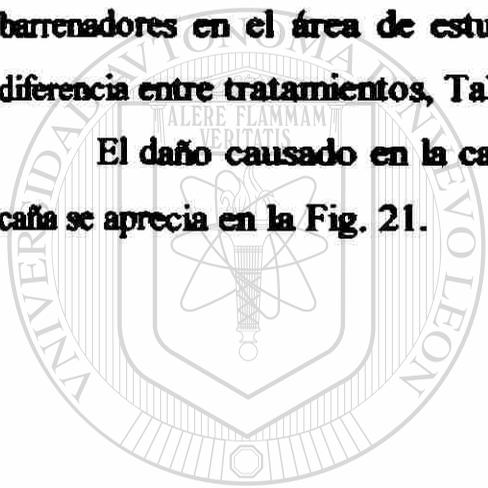
La Tabla 17 presenta los promedios de las cepas con daño de barrenador por tratamiento. Se aprecia que las mayores cantidades de cepa con incidencia de daño ocurrieron en la etapa inicial del experimento, esto es, el día de la aplicación y 5 días después. En los muestreos a los 38 y 64 días después de 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 mas 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

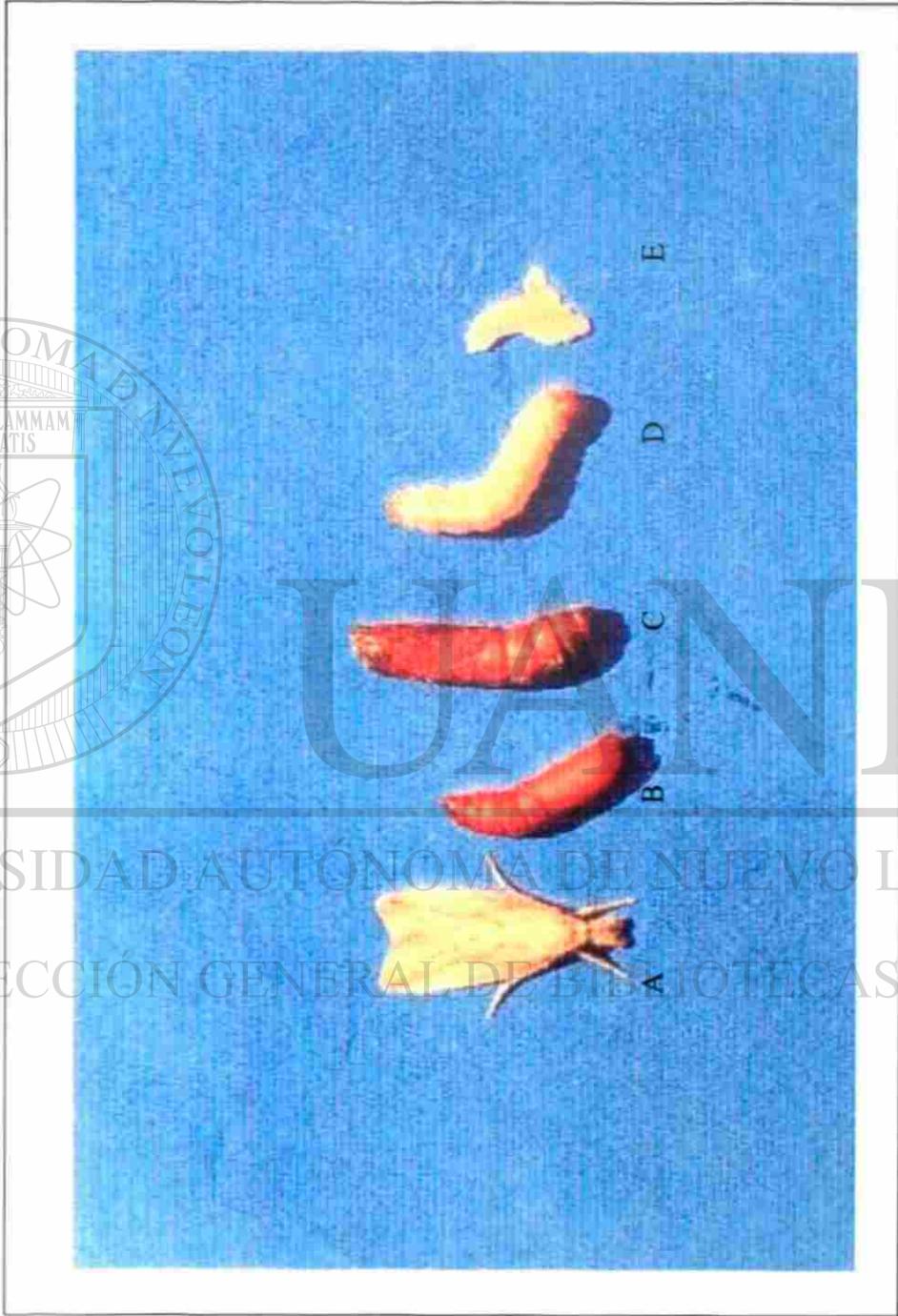


Fig. 9. Ciclo biológico de *Diatraea saccharalis*. A) adulto, B) pupa macho, C) pupa hembra, D) larva, E) huevecillos

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

Cepas	50µg/ml	500µg/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

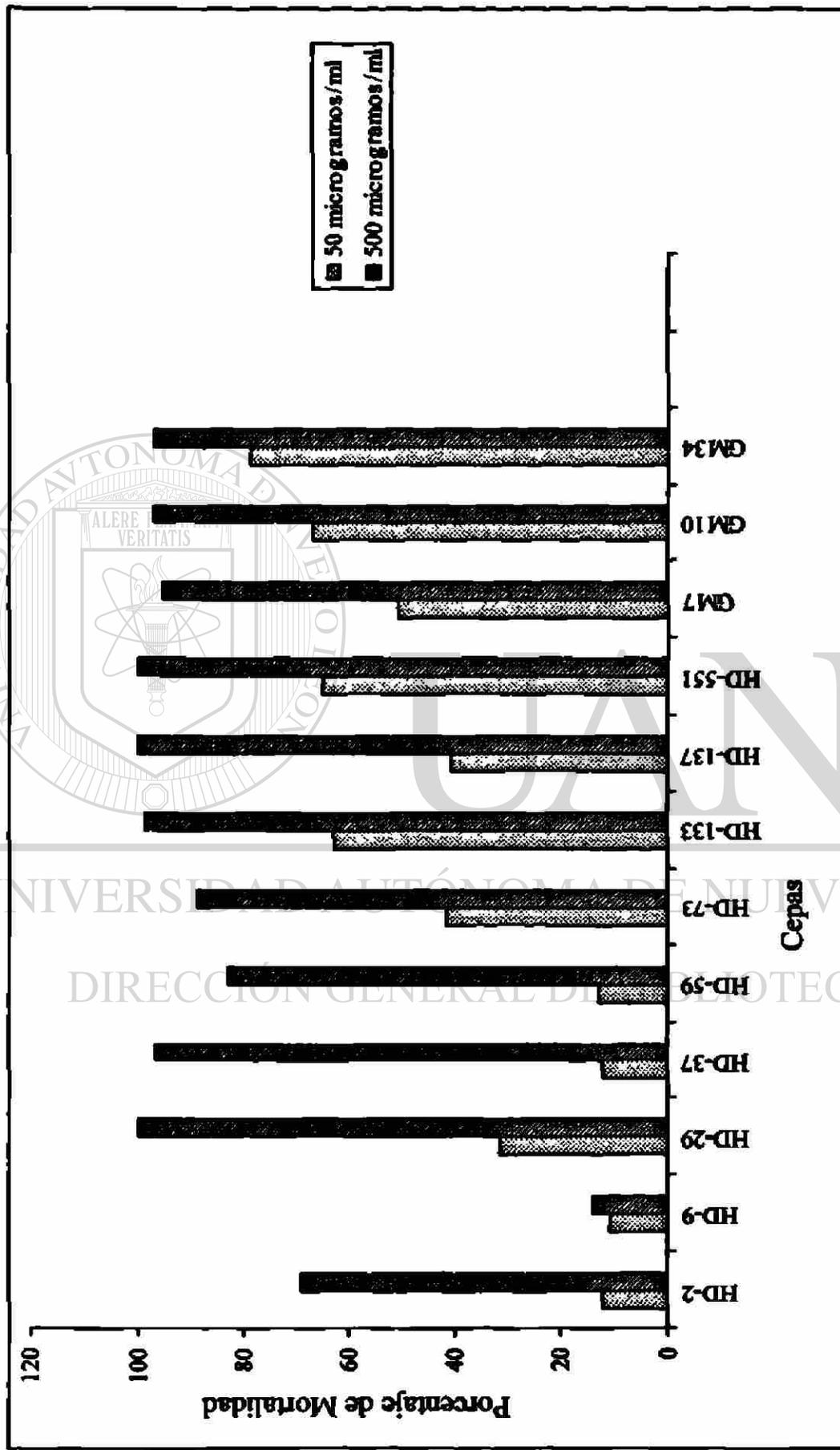


Fig 10. Bioensayo de mortalidad de las 12 cepas de *B. thuringiensis* contra larvas de dos días de edad de *D. saccharalis*.

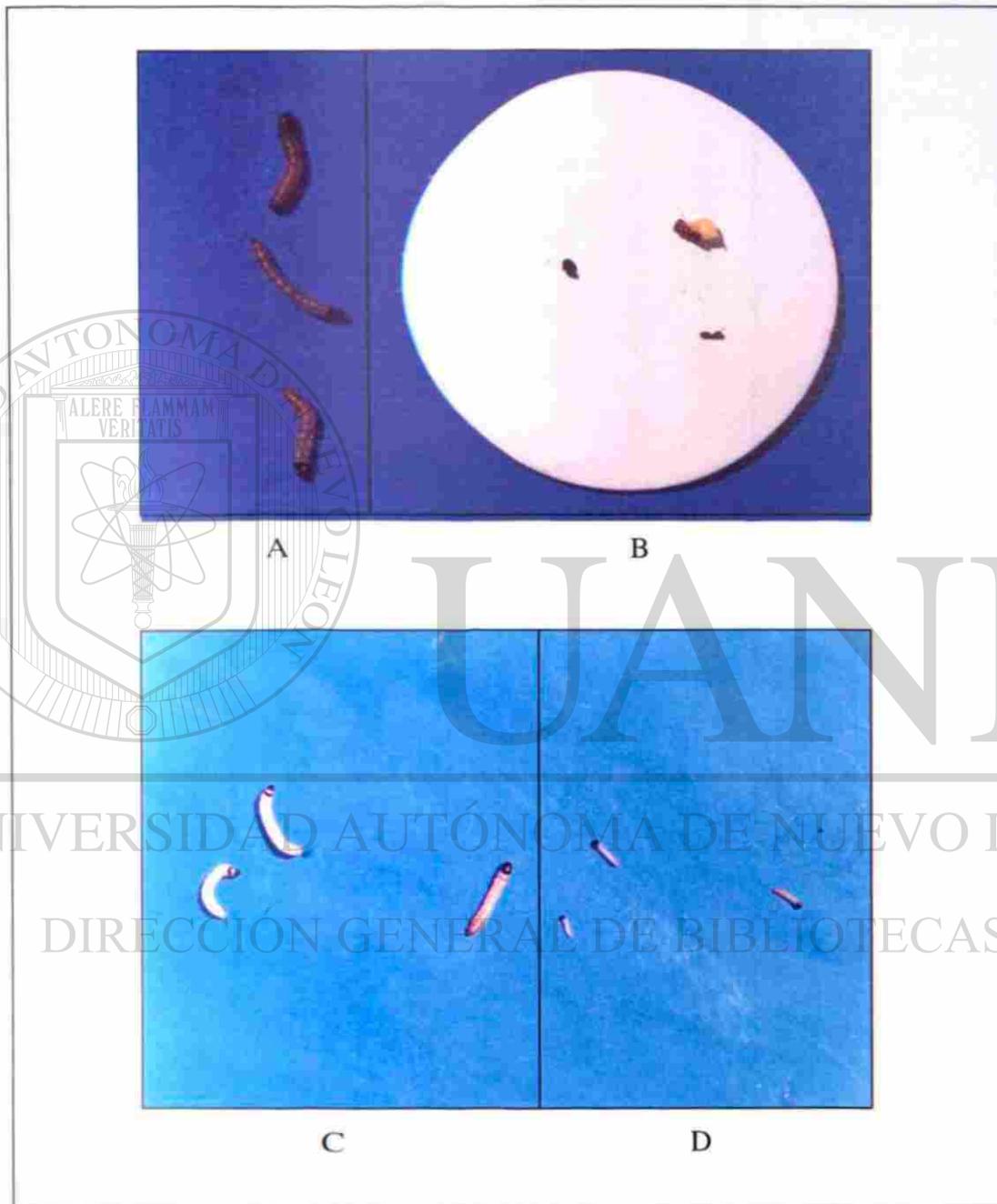
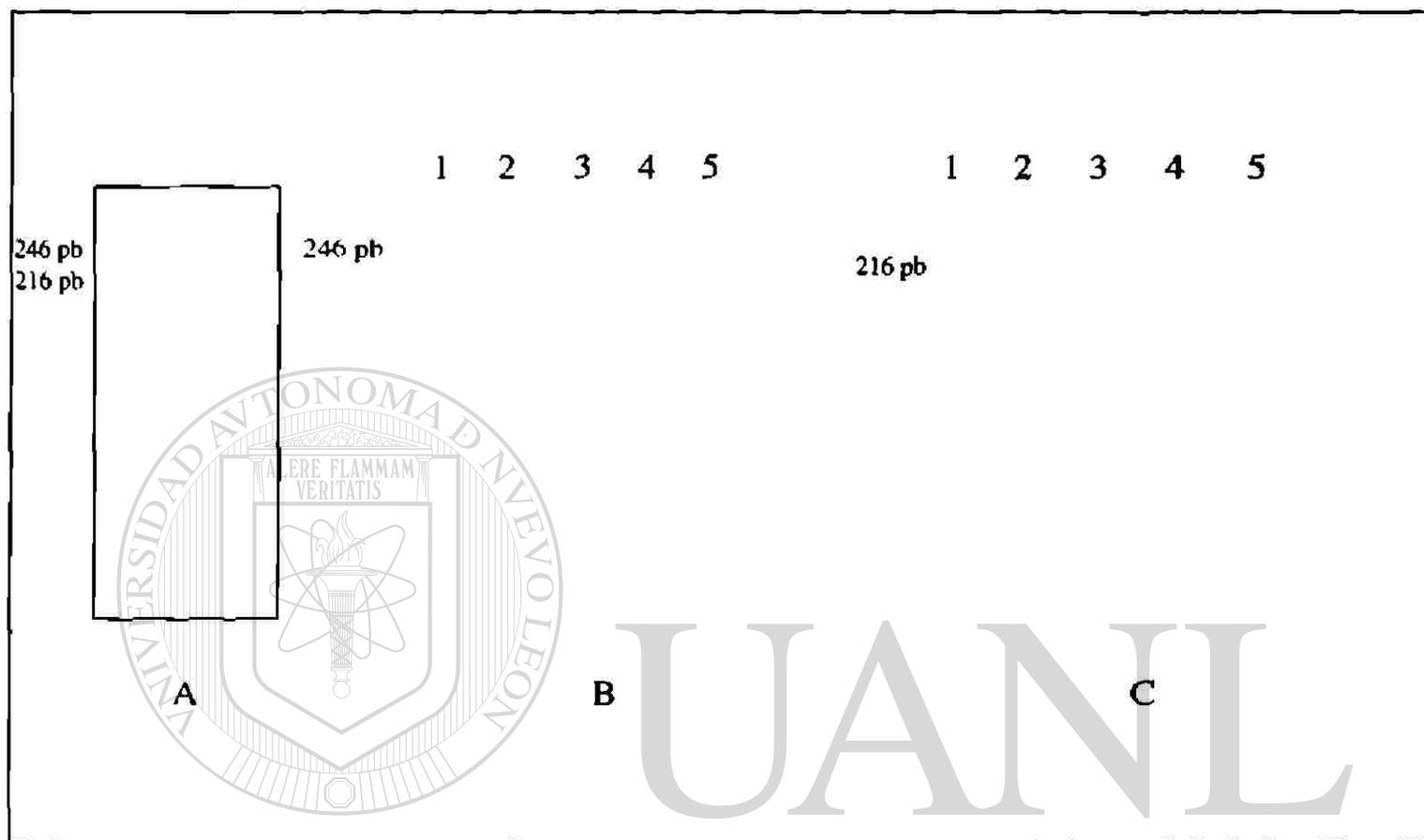


Fig 11. Larvas obtenidas después de la realización de los bioensayos. En cada una de ellas se muestran las larvas control, así como las larvas muertas y las sobrevivientes, pero intoxicadas. A) y C) larvas control de 9 días de edad, B) larvas muertas, D) larvas intoxicadas de 9 días de edad.

Tabla 11. Presencia de genes *cry* I A, 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>cry</i> I Aa, <i>cry</i> I Ab, <i>cry</i> I C
HD-551	<i>cry</i> I Aa, <i>cry</i> I Ab <i>cry</i> I B
GM7	<i>cry</i> I Aa, <i>cry</i> I Ab <i>cry</i> I B
GM10	<i>cry</i> I Aa, <i>cry</i> I Ab, <i>cry</i> I Ac, <i>cry</i> I C
GM34	<i>cry</i> I Aa, <i>cry</i> I Ab, <i>cry</i> I Ac



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

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

Panel A) cepa HD-1, carril 1, *cryIAa*; 2, *cryIAb*.

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

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

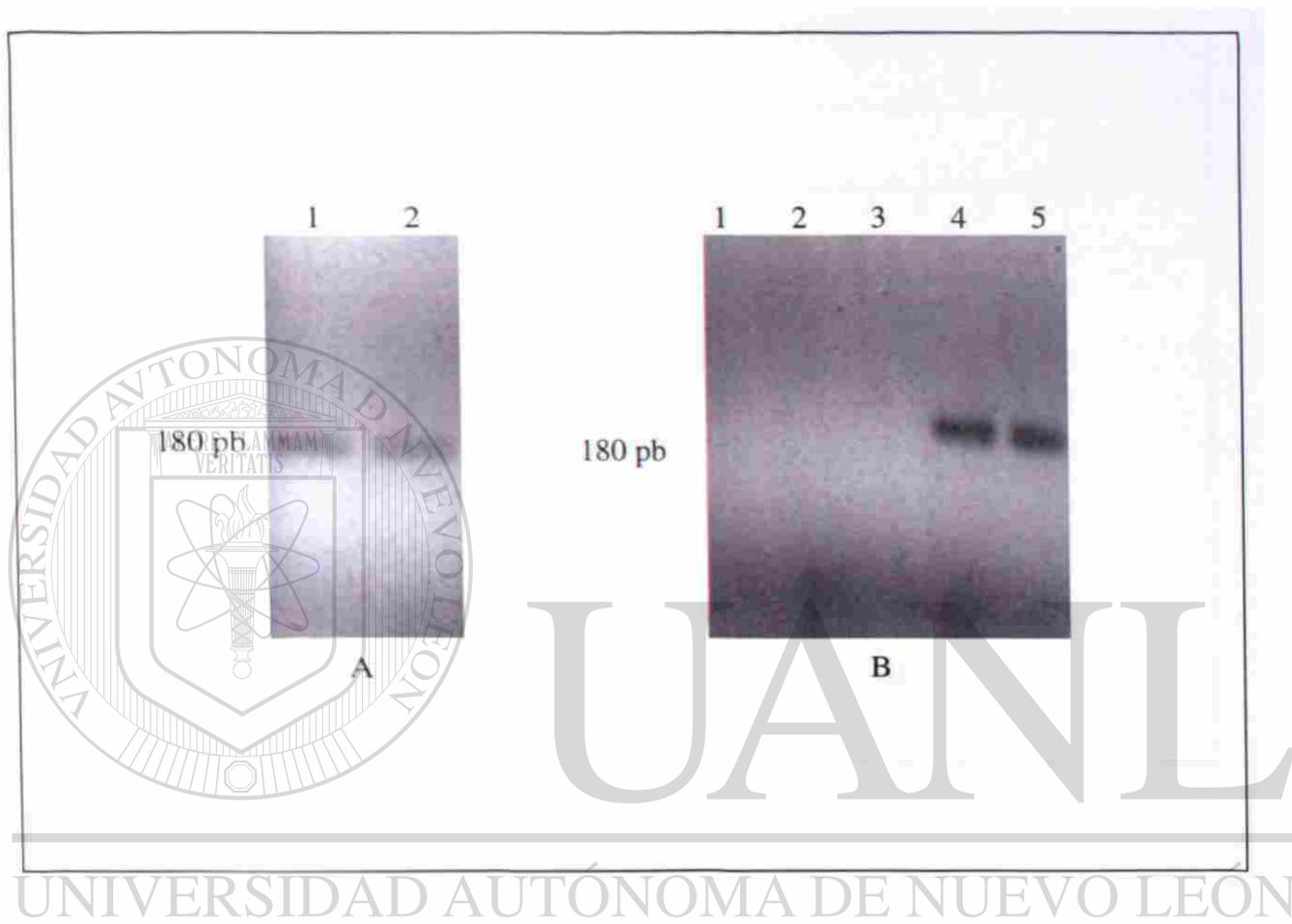


Fig 13. Detección del gen *cry1Ac* en diferentes cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*.

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.

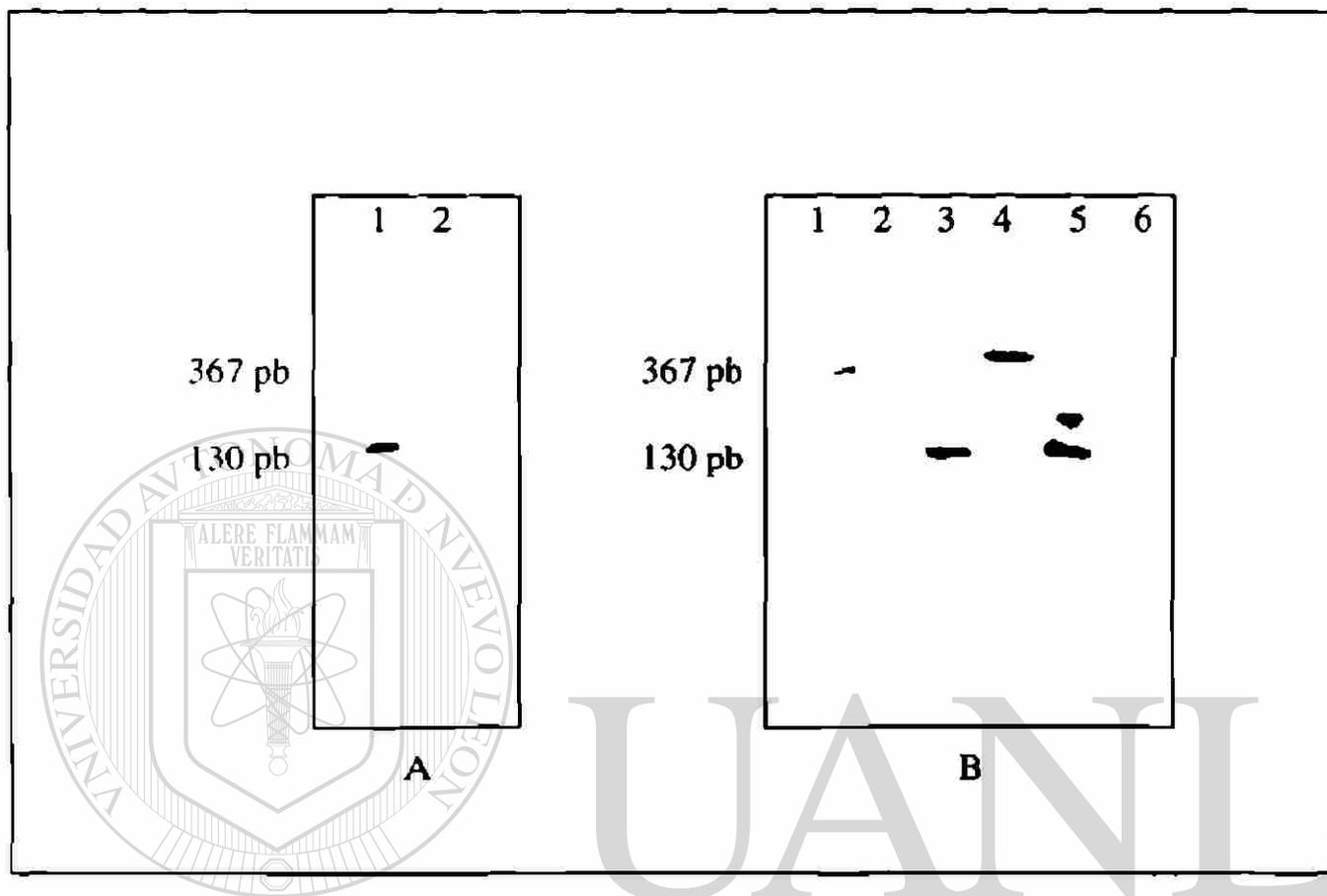


Fig. 14. Detección de los genes *cry1B* y *cry1C* en diferentes cepas de *B. thuringiensis* tóxicas contra *D. saccharalis*..

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 espора-сristal 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> ^a	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 ^a	65.91	56.47 – 76.92	1.98

^{*} µg/ml. ^a = 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	F=24.6526, gl=1, P<0.01	2.22 ± 0.1005
	P. sin fagoestimulantes		1.30 ± 0.1099
2	P. con Coax® vs	F=113.4801, gl=1, P<0.01	1.47 ± 0.1293
	P. con caña en polvo		3.96 ± 0.1952
3	P. con caña en polvo vs	F=54.1671, gl=1, P<0.01	2.71 ± 0.1341
	P. con azúcar		1.22 ± 0.1034
4	P. con Coax® vs	F=29.1455, gl=1, P<0.01	1.47 ± 0.1293
	P. con azúcar		2.59 ± 0.1319
5	Caña de azúcar fresca ² vs	F=534.9322, gl=1, P<0.01	8.65 ± 0.1898
	Todos los soportes		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 \pm ES
A	0.8667 \pm 0.1455 ^{ab}
A1	0.5833 \pm 0.1122 ^a
A2	0.8167 \pm 0.1416 ^{ab}
A3	2.9167 \pm 0.2962 ^d
B	1.2333 \pm 0.1670 ^{abc}
B1	1.8833 \pm 0.2505 ^{bcd}
B2	1.5000 \pm 0.1706 ^{abc}
B3	4.8000 \pm 0.3610 ^e
C	1.8000 \pm 0.2314 ^{bc}
C1	1.9500 \pm 0.2382 ^{cd}
C2	1.3500 \pm 0.2097 ^{abc}
C3	4.1833 \pm 0.3122 ^e
D	8.6500 \pm 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, $P \leq 0.05$.
 D = Piezas de caña de azúcar fresca utilizadas como control.

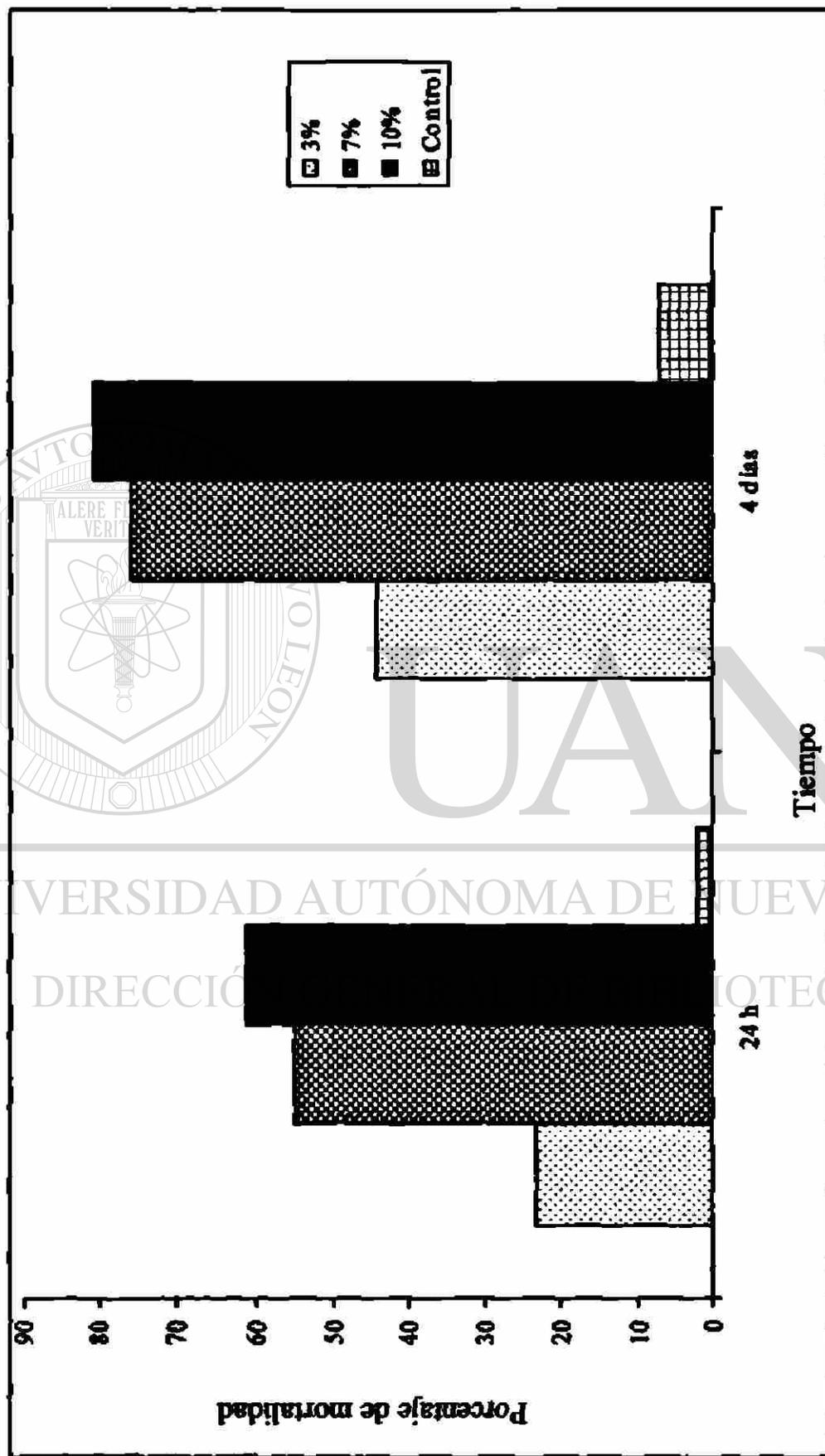


Fig. 16. Mortalidad causada a *D. saccharalis* por formulados granulados a base de la cepa GM34 de *B. thuringiensis* en bioensayos de laboratorio.

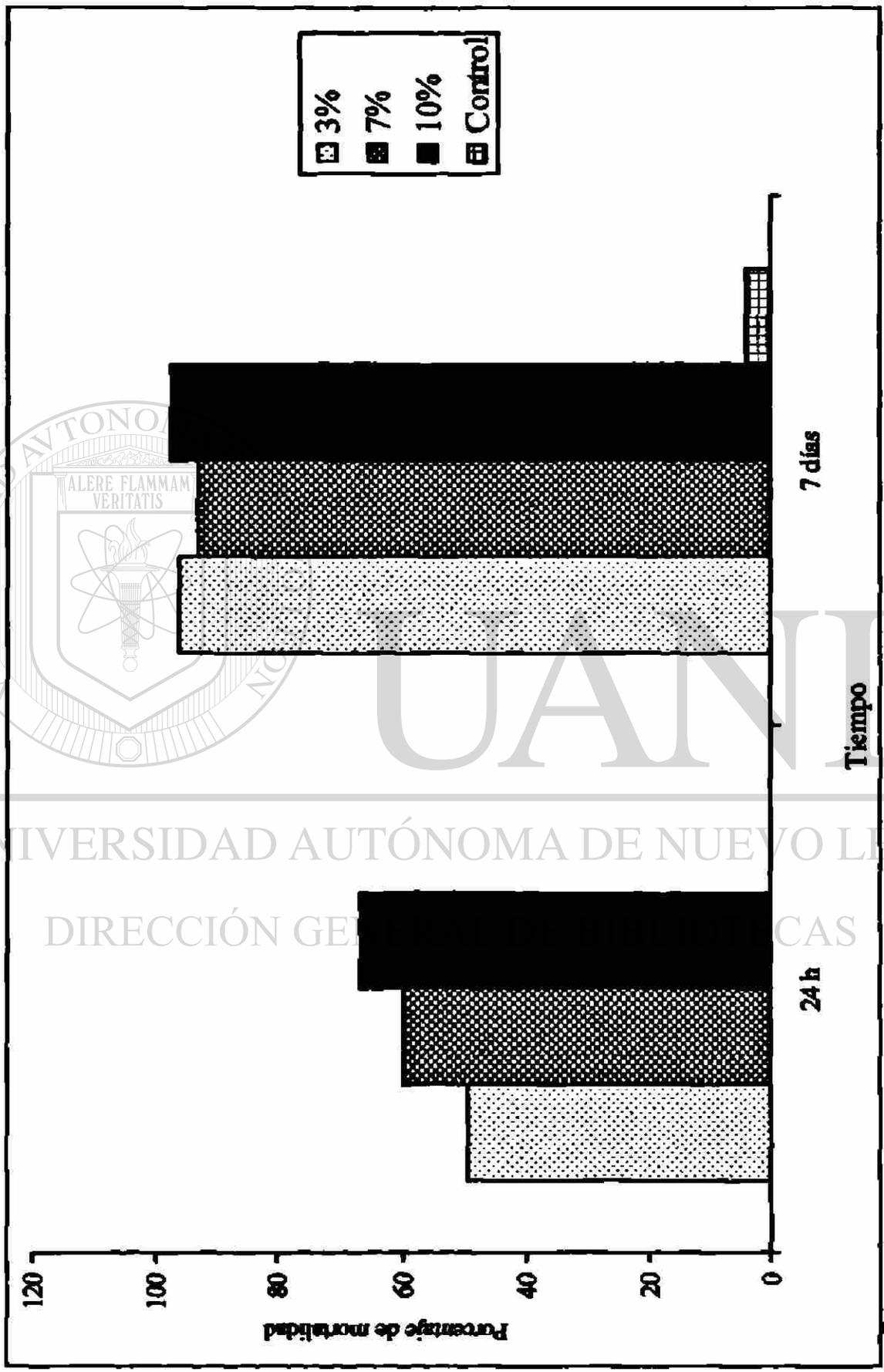


Fig. 17 . Mortalidad causada a *D. saccharalis* por formulados asperjables a base de la cepa GM34 de *B. thuringiensis* en bioensayos de laboratorio.

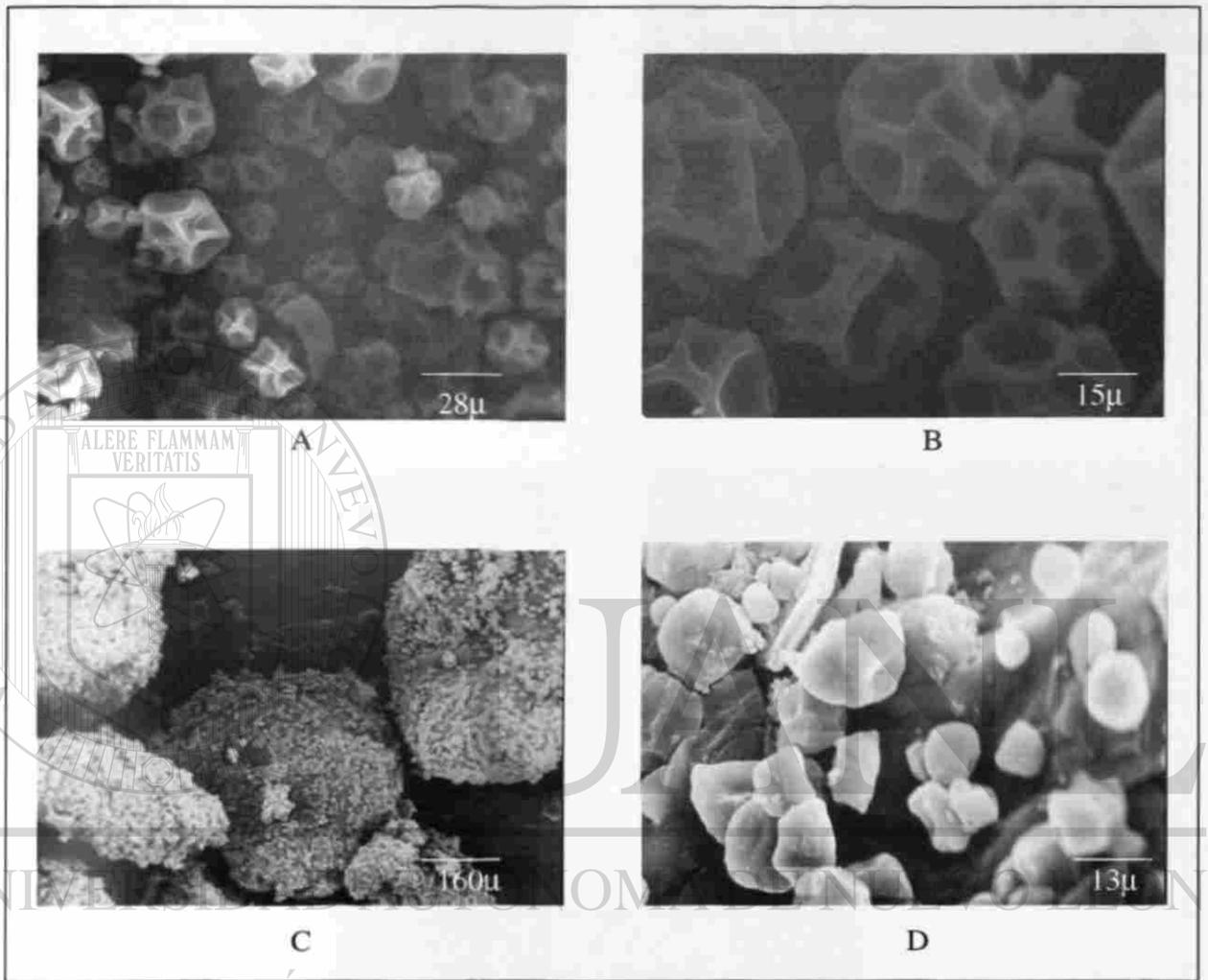


Fig. 18. Fotografías al microscopio electrónico de barrido. A) y B) corresponden al formulado asperjable al 10%. C) y D) corresponden al formulado granular al 10%.

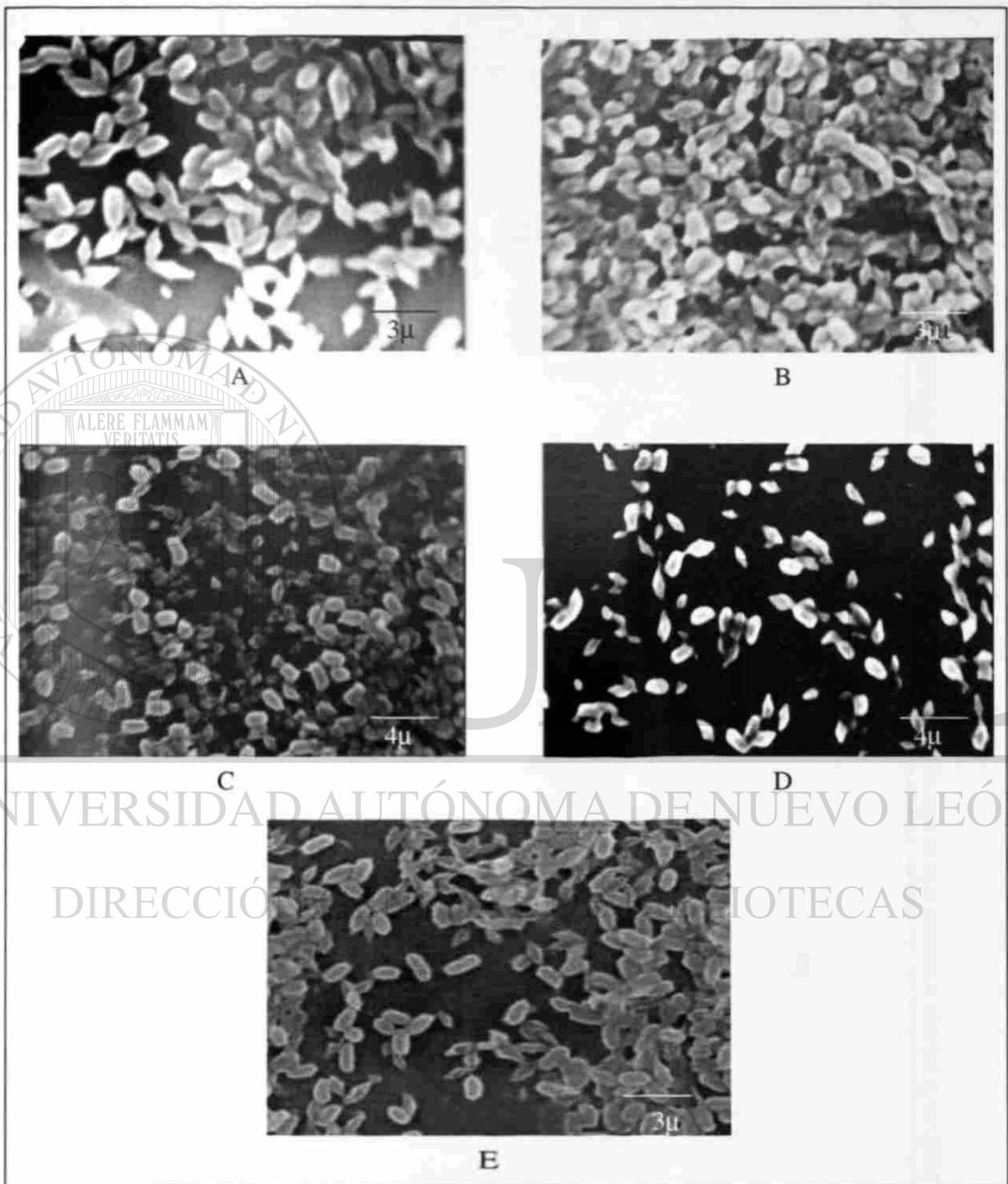


Fig. 19. Esporas y cristales de las cepas que resultaron tóxicas a *Diatraea saccharalis*, observadas al microscopio electrónico de barrido. A) cepa HD-133, B) cepa HD-551, C) cepa GM34, D) cepa GM10, y E) cepa GM7.

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 ^{bc}
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
Coefficiente 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 \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS	Media \pm DS
1	11 \pm 8.86	11 \pm 3.56	1.75 \pm 0.95	1.5 \pm 1
2	10.25 \pm 5.91	13.5 \pm 2.51	2.25 \pm 2.63	1.25 \pm 1.89
3	10.5 \pm 7.14	10 \pm 2.94	1.75 \pm 2.36	2.25 \pm 1.70
4	10 \pm 4	16 \pm 7.61	2.75 \pm 3.20	2.25 \pm 2.21
5	12.25 \pm 3.86	12.25 \pm 5.19	1.75 \pm 2.06	1.75 \pm 2.21
6	5.5 \pm 4.43	12.5 \pm 1.73	2.25 \pm 2.87	1.25 \pm 1.5
7	17.25 \pm 1.81	4.25 \pm 1.5	2 \pm 2.16	0.75 \pm 0.95
8	8.25 \pm 0.5	4.25 \pm 2.06	2 \pm 2.16	2 \pm 1.82
9	10 \pm 2.31	4 \pm 2.16	2.25 \pm 2.21	1.5 \pm 1.29
10	11.75 \pm 5.73	2.5 \pm 1.29	2.0 \pm 0.81	2.0 \pm 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 barrenadores 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	0.04167	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



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*.

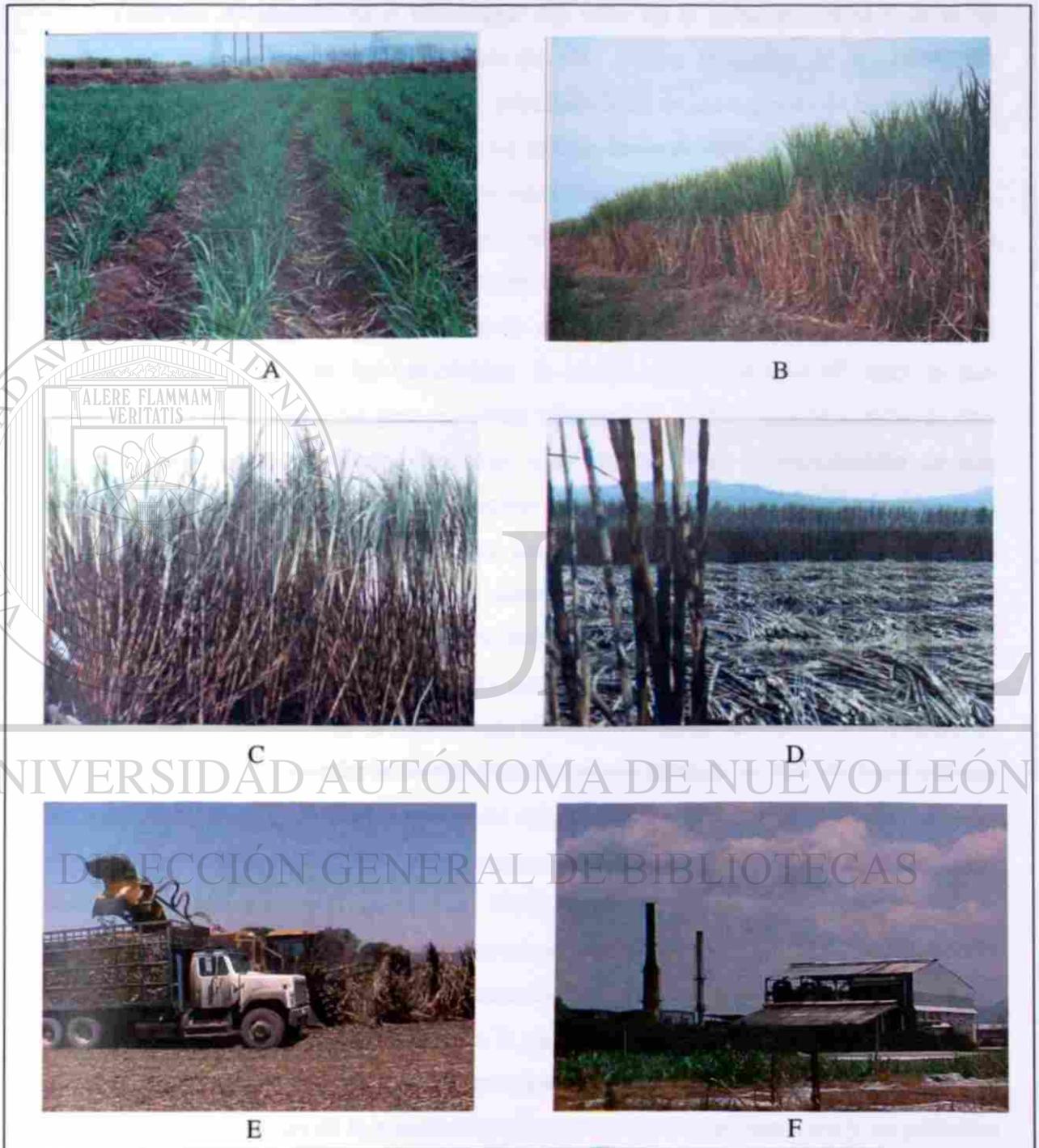


Fig. 21. Cultivo de caña de azúcar y su procesamiento. A) caña en crecimiento, B) caña de 12 meses de edad, apta para procesamiento, C) quema de la caña y D), E) y F) corte, recolección y procesamiento en el ingenio.

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 CL_{50} 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 liofilizado causó una actividad intermedia, Gillespie 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 Gillespie 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^{er} o 2^o 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 inmunodetección 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 cafetera, 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.

Agaisse, 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* (Lepidoptera: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. Deghebe, 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. Ultrastructural 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.

Bietlot, 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 lepidopteran 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* CryIAc 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 bacteriophage nematodos (Nematoda: Rhabditida). *J. Invertebr. Pathol.* 65: 61-67.

Bouquet, 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. Delécluse, F. De la torre y J. Szulmajster. 1990. Transfer of the toxin protein genes of *Bacillus thuringiensis* *sphaericus* 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 CryIB 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 (*Lepidoptera: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 polimerase 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. Gúterca 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 of the crystal protein gene under the control of the α -amylase promoter in *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.

Fiuzza, 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 alginate 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* (Hubner), *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 analysis 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. Suppression 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 an 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 ultravioleta protectants to increase sunlight stability of an insect virus. J. Econ. Entomol. 64: 850-853.

Ignoffo, C. M. y C. García. 1978. UV-photoinactivation 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. Suppression 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. Koliais, T. Manousis, D. Ellar y C. Kastritsis. 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 colepteran 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 CryIAa and CryIAc on the gypsy 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* CryIA 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. Cottrill, A. P. Valaitis y D. H. Dean. 1996. Aminopeptidase N purified from gypsy moth brush border membrane vesicles is a specific receptor for *Bacillus thuringiensis* CryIAc 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. Kubisnki. 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.

Lorence, 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 suspension 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. Saldafia. 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. Puztai-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. Puztai-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 from NRD-12 isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* expressed in *Escherichia coli* and *Bacillus thuringiensis* 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. Inscoc. 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 leafminer (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. Whipps 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* (Hymenoptera: 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.

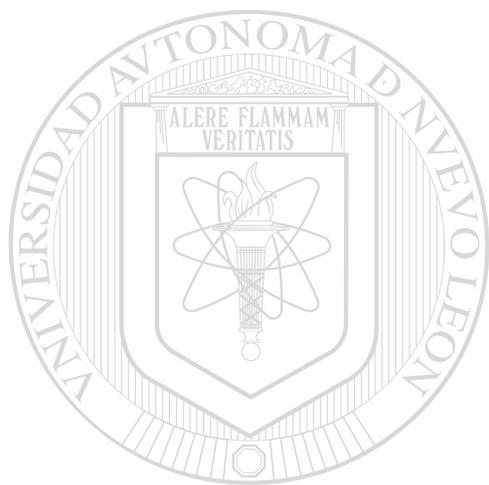
Yendol, W. G., R. A. Hamlen y S. B. Rosario. 1975. Feeding behavior of gypsy moth larvae on *Bacillus thuringiensis*-treated foliage. *J. Econ. Entomol.* 68: 25-27.

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. Ghidui 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.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN[®]
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



