

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE FORMULADOS  
ASPERJABLES DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL  
CONTROL DEL GUSANO DE BOLSA DEL NOGAL  
*Hyphantria cunea* (DRURY)**

**Por**

**M. en C. LUCIA LETICIA PALACIOS CORTEZ**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA**

**Septiembre, 2014**

DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE FORMULADOS  
ASPERJABLES DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL  
CONTROL DEL GUSANO DE BOLSA DEL NOGAL  
*Hyphantria cunea* (DRURY)



---

Dra. Lilia H. Morales Ramos  
PRESIDENTE



---

Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado  
Secretario



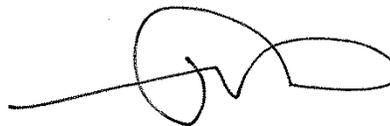
---

Dra. Katiushka Arévalo Niño  
Vocal



---

Dra. Isela Quintero Zapata  
Vocal



---

Dr. Luis J. Galán Wong  
Vocal



Este trabajo se llevó a cabo bajo la dirección de la Dra. Lilia H. Morales Ramos, en el Laboratorio 1 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

## AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Lilia H. Morales Ramos** con quien estoy profundamente agradecida por su confianza, apoyo, dirección y paciencia para la realización de este proyecto.

Al **Dr. Luis J. Galán Wong** por darme la oportunidad de ser parte de su equipo de trabajo.

A la **Dra. Katiushka Arevalo Niño** por todas las facilidades proporcionadas durante todo este tiempo, por los consejos y ayuda.

A la **Dra. Isela Quintero Zapata** por su empatía y acertados comentarios en la revisión de este manuscrito.

Al **Dr. Carlos Fco. Sandoval Coronado** por los consejos, soporte e interés mostrado para la realización de esta tesis.

A la **Dra. Magdalena Iracheta** por su ayuda incondicional, sus exhortaciones, sugerencias y buena disposición, por su amistad.

A la **Dra. Marivel Gómez Treviño** porque su mano siempre estuvo abierta para mi, por su amistad e interés hacia mi superación como persona.

Al **Dr. Sergio M. Salcedo** por su desinteresada colaboración y ayuda en la traducción.

Al **Sr. Feliciano Molina** por su gran apoyo y orientación en la implementación de la cría del insecto en laboratorio.

A **Fundación Produce N.L. A.C.** por el apoyo económico otorgado al proyecto clave 19-2005-1925.

Al programa **PAICYT**, por el apoyo aportado al proyecto de investigación clave CN 1314-06.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACYT**) por la beca otorgada para la realización de este trabajo No. de Registro 42639.

## DEDICATORIA

A **Jehová Dios** que sin su guía y dirección constante mediante su palabra no logramos nada, por rodearme de gente maravillosa que me quiere, y mucho.

A **Francisco Medina**, mi Esposo, con quien siempre comparto inquietudes, y que con tu paciencia y sostén me da la confianza y seguridad de continuar.

A mis dos inspiraciones para vivir **Samgar Francisco Azgad** y **Lucia Jeqabzeel**, mi energía para seguir adelante.

A mi Madre **Sra. Julia Cortés**, que nos enseñó su fortaleza como el mejor ejemplo para vivir.

A mis hermanas, **Clara** y **Ofelia** mis cómplices, en las buenas y en las malas, siempre conmigo.

A mis sobrinas, **Jesaya, Rebeca, Izar, Andrea, Angélica**, por el interés mostrado en mi trabajo.

A mis compañeros y amigos del IB, afortunadamente son muchos, quienes siempre han estado al pendiente.

Y a todas aquellas personas que no repararon en extenderme la mano y brindarme su ayuda, Gracias.

*“Digno eres tú, Jehová, nuestro Dios mismo, de recibir la gloria y la honra y el poder, porque tú creaste todas las cosas, y a causa de tu voluntad existieron y fueron creadas.” Revelación 4:11*

*“Busquen a Jehová, todos ustedes los mansos de la tierra, los que han practicado Su propia decisión judicial. Busquen justicia, busquen mansedumbre. Probablemente se les oculte en el día de la cólera de Jehová.” Sofonías 2:3*

# ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE FIGURAS	XII
LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS	XV
RESUMEN	XVI
ABSTRACT	XVII
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
HISTORIA DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	3
TOXINAS DE <i>B. thuringiensis</i>	5
MODO DE ACCION	8
FORMULACIONES	12
ASPECTOS BÁSICOS DE LAS FORMULACIONES	12
FORMULACIONES CON <i>B. thuringiensis</i>	17
FORMULACIONES MICROENCAPSULADOS	24
FORMULACIONES Y PRINCIPIO ACTIVO	26
RECUPERACIÓN DEL INSECTICIDA	27
EL MERCADO DE LOS BIOPESTICIDAS	29
IMPORTANCIA DEL NOGAL	33
IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LA NUEZ PECANERA	35
INSECTO BLANCO	37
CRÍA DE NIVEL DE LABORATORIO	39
IMPORTANCIA	41
ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION	43
HIPÓTESIS	44
OBJETIVO GENERAL	44
OBJETIVOS PARTICULARES	44

## MATERIALES Y MÉTODOS

1. Implementación de la cría masiva de <i>Hyphantria cunea</i> a nivel de laboratorio.	46
2. Selección de cepas de <i>B. thuringiensis</i> con actividad toxica contra <i>H. cunea</i> .	49
a) Obtención de Biomasa.	49
b) Determinación del perfil de proteínas de las cepas probadas.	50
3. Evaluación preliminar del efecto tóxico de la biomasa de <i>B. thuringiensis</i> contra <i>H. cunea</i> .	52
4. Determinación de CL <sub>50</sub> , CL <sub>90</sub> y TL <sub>50</sub> .	53
5. Propagación de la cepa que presente la mayor toxicidad contra <i>H. cunea</i> .	53
6. Bioensayos de Preferencia Alimenticia para <i>H. cunea</i> .	
a) Preparaciones Granulares.	54
b) Preferencia Alimenticia.	55
7. Formulaciones Asperjables de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	60
8. Evaluación de la Actividad Insecticida de los Formulados Asperjables.	62
9. Determinación de Suspensibilidad de los Formulados	63
10. Factibilidad de Aspersión a los Formulados	63
11. Prueba de Adherencia en Portaobjetos	65
12. Evaluación de los formulados a nivel de invernadero	67
a) Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones en Invernadero.	67
b) Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados.	69
RESULTADOS Y DISCUSIONES	71
Implementación de la cría masiva.	71
Estimación de la toxicidad.	73
Bioensayos de Preferencia Alimenticia.	80
Formulaciones Asperjables de <i>Bacillus thuringiensis</i> .	85
Evaluación de la Actividad Insecticida de los Formulados Asperjables.	90

Evaluación de la Vida de Anaquel de las Formulaciones	92
Determinación de Suspensibilidad de los Formulados Asperjables.	95
Factibilidad de Aspersión de los Formulados.	104
Determinación de la Adherencia de los Formulados a portaobjetos.	104
Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones en Invernadero.	110
Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados.	118
CONCLUSIONES	125
PERSPECTIVAS	127
BIBLIOGRAFIA	128
RESUMEN BIBLIOGRAFICO	151

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1.	Bioinsecticidas más comunes comercialmente basados en <i>B. thuringiensis</i> .
2.	Estimación total del mercado mundial para todo tipo de biopesticidas (incluyendo productos bioquímicos), hasta el año 2014 (\$ EE.UU. millones).
3.	Composición de los Soportes Granulares para la determinación de la preferencia alimenticia hacia larvas de <i>Hyphantria cunea</i> Drury.
4.	Elaboración de Formulados Asperjables de <i>B. thuringiensis</i> GM-10 para el control de <i>Hyphantria cunea</i> .
5.	Cuantificación de Proteína Activa y Determinación de la cuenta de esporas de la Biomasa de las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> .
6.	Prueba preliminar de la mortalidad ( $\pm$ DE) de las cepas probadas de <i>Bacillus thuringiensis</i> contra larvas neonatas de <i>Hyphantria cunea</i> Drury.
7.	Susceptibilidad de <i>Hyphantria cunea</i> a la toxina activa de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .
8.	Tiempo Letal medio de <i>Hyphantria cunea</i> a la toxina activa de cepas de <i>B. thuringiensis</i> .
9.	Selección de los soportes Granulares con carácter de fagoestimulante para <i>Hyphantria cunea</i> .
10.	Efecto de la presencia o ausencia de fagoestimulantes en los soportes de formulación granulares para <i>Hyphantria cunea</i> .
11.	Efecto de los controles en los soportes de formulación granulares para <i>Hyphantria cunea</i> .

12. Determinación de la Cuenta de Esporas de los Formulados Asperjables de *Bacillus thuringiensis*.
13. Evaluación de los Formulados Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.
14. Efecto de la presencia o ausencia de *B. thuringiensis* en las Formulaciones Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.
15. Efecto de la presencia o ausencia de aditivos en las Formulaciones Asperjables atractivos para *Hyphantria cunea*.
16. Efecto de la presencia de las gomas como aditivos en los Formulados Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.
17. Actividad Insecticida de las Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
18. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
19. Efecto del almacenamiento a Temperatura Ambiente sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
20. Efecto del almacenamiento a Temperatura de Refrigeración sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
21. Efecto de la Temperatura de almacenamiento sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
22. Suspensibilidad Media de las partículas reconstituidas (gr/ml) de los Formulados evaluados.
23. Media de las partículas suspendidas (gr/ml) de los Formulados Asperjables en presencia o ausencia de BT.

24. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr/ml) de los Formulados Asperjables con BT y Formulados con Lactosa Acetona.
25. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr/ml) de los Formulados Asperjables con BT y Formulados Dipel.
26. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr/ml) de los Formulados Asperjables sin BT.
27. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables y comerciales.
28. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables Sin *B. thuringiensis*, y el adherente comercial Bionex®.
29. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables sin BT.
30. Comparación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables, el comercial Dipel y el adherente comercial Bionex®.
31. Evaluación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables con BT y Formulados comerciales Dipel.
32. Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones Asperjables Con *B. thuringiensis* en ausencia o presencia de lluvia simulada contra *Hyphantria cunea* .

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1.	Número de nuevos productos químicos contra el número de productos plaguicidas sintéticos lanzados 1995-2010. (Glare <i>et al.</i> 2012).
2.	Aumento de costos en millones de dólares en el tiempo para desarrollar un nuevo pesticida químico. (Glare <i>et al.</i> 2012).
3.	a).- Nidos de <i>H. cunea</i> infectando arboles de Nogal. b).- Larvas de <i>H. cunea</i> alimentándose de hojas de Nogal Fresco. c).- Pupas de <i>H. cunea</i> . d).- Pupas de <i>H. cunea</i> en diapausa. e).- Cubetas, revestidas con papel encerado y vasitos son algodón impregnado de sacarosa 15%. f).- Adultos de <i>H. cunea</i> , hembras y machos.
4.	a).- <i>H. cunea</i> adulto ovopositando sobre papel encerado b).- Masa de huevecillos sin eclacionar. c).- Masa de huevecillos colocada en la parte superior de vasos desechables de 12 oz. que contiene dieta nutritiva Shorey. d).- Masa de huevecillos en la superficie de malla eclacionando. e).- Larvas de <i>H. cunea</i> al fondo del vaso alimentándose sobre la dieta de desarrollo Shorey. f).- Larvas de <i>H. cunea</i> después de 15 días alimentándose.
5.	Perfil de proteínas de las cepas de <i>B. thuringiensis</i> Gel de electroforesis en poliacrilamida. Panel A).- carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2; HD-1, carril 3; GM-2, carril 4; GM-7, carril 5; GM-10, carril 6; GM-13. Panel B).- carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2; GM-18, carril 3; GM-33, carril 4; GM- 34, carril 5; GM-43, carril 6; GM-58.

6. Propagación de *Bacillus thuringiensis*, a nivel Fermentador de 14 l., para la Obtención de Biomasa.
7. Determinación de Preferencia Alimenticia de *H. cunea*, se probaron varios hospederos del insecto plaga como fagoestimulantes. a).- Hoja de Nogal, b).- Hoja de Cenizo, c).- Hoja de Mora, d).- Hoja de Níspero, e).- Cascara de Nuez, f).- Coax<sup>®</sup>.
8. Elaboración de los Aditivos como Fagoestimulantes. Molienda en molino de perlas, Cribas. Polvo de tamaño de partícula uniforme.
9. Determinación de la Suspensibilidad de los Tratamientos; se midió en probetas de 125 ml. por un periodo de 8 h.
10. Prueba de adherencia en Portaobjetos, a).- Los tratamientos se extendieron en la superficie del portaobjetos, b).- se dejaron secar por 24 h. c).- Se lavaron con un volumen constante de agua destilada, d).- Se tararon y pesaron.
11. Persistencia de las formulaciones en Invernadero. a y b).-larvas de *H. cunea* alimentándose de los trozos de hojas de Nogal asperjadas con las formulaciones. c).- larvas de *H. cunea* alimentándose después de la dieta Shorey.
12. Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados
- 13.- Suspensibilidad de los Formulados elaborados con *B. thuringiensis* y el procesado con Lactosa Acetona (L-A) en porciento de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.
- 14.- Suspensibilidad de los Formulados elaborados con Bt y Formulado Comercial Dipel, en porciento de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.
- 15.- Suspensibilidad de los Formulados elaborados sin Bt y el control Agua en porciento de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.

16. Factibilidad de Aspersión de los Formulados Asperjables de *B. thuringiensis* utilizando un aspersor con boquilla de apertura 0.5  $\mu\text{m}$  y 5 lb de presión.
17. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt GG.
18. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt GX.
19. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt GC.
20. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt S/A.
21. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado DIPEL.
22. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con los Tratamientos sin *B. thuringiensis*.

## LISTA DE SIMBOLOS Y ABREVIATURAS

BT	<i>Bacillus thuringiensis</i>	mA	Miliamperios
°N	Grados Norte	kDa	Kilodaltons
°C	Grados Centígrados	Mol wt	Peso Mol
α-	alfa	ANOVA	Análisis de Varianza
β-	beta	DE	Desviación Estándar
τ-	teta	EE	Error Estándar
δ-	delta	gl	Grados de Libertad
Kg	Kilogramos	F	Efe calculada
gr	Gramos	P	Probabilidad
mg	Miligramos	X <sup>2</sup>	Hi cuadrada
ng	Nanogramos	®	Marca Registrada
ml	Mililitro	UV	Ultravioleta
μl	Microlitros		
μg	Microgramos		
μm	Micrómetros		
oz.	Onzas		
h	Horas		
lb	Libras		
m	Metros		
nm	Nanómetros		
cm <sup>2</sup>	Centímetro cuadrado		
pH	Punto de Hidrogeno		
HR	Humedad Relativa		
CL <sub>50</sub>	Concentración Letal Media		
TL <sub>50</sub>	Tiempo Letal Medio		
% de M	Porciento de Mortalidad		
v/v	Volumen sobre Volumen		
P/P	Peso sobre Peso		
r.p.m.	Revoluciones por Minuto		
vvm	Volumen de aire por Volumen de medio por Minuto		
UFC	Unidades Formadoras de Colonias		
MIP	Manejo Integrado de Plagas		
SAGARPA	Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación		

## RESUMEN

El cultivo del nogal es de gran valor comercial, Estados Unidos, Canadá y México, son los principales mercados para la nuez. *Hyphantria cunea* ataca una gran variedad de árboles, se han identificado más de 600 especies de plantas hospederas, el nogal es una de ellas, afectando su productividad. Para la búsqueda de cepas de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica hacia este insecto, se implemento la cría de *H. cunea* a nivel de laboratorio, alimentando las larvas con la dieta Shorey en condiciones de laboratorio, con HR de 70-80%, temperatura 26-28°C y fotoperiodos 14/10. Se probaron 10 cepas nativas y de colección; HD-1, GM-2, GM-7, GM-10, GM-13, GM-18, GM-33, GM-34, GM-43 y GM-58, de las cuales siete presentaron mortalidad arriba del 80%. La CL<sub>50</sub> de las cepa GM-10 presento los mejores valores, 0.007 ng/cm<sup>2</sup>, y TL<sub>50</sub> de 80.83 horas. Ensayos de preferencia alimenticia utilizando hojas en polvo de Nogal, Mora, Cenizo, Níspero y polvo de cascara de Nuez como posibles fagoestimulantes y uno comercial Coax®, mostro al Cenizo como preferido por *H. cunea*, con 61.4% de las larvas atraídas hacia este. Con el fagoestimulante anterior se desarrollaron formulaciones encapsuladas con una mezcla de polímeros (Capsul®-gelatina), como base, y se prepararon 4 Tratamientos, utilizando la cepa GM-10 y aditivos (Goma de Guar, Goma Core y Goma Xantana), mas una mezcla sin aditivos (S/A), además 4 Tratamientos iguales pero sin BT. Se realizaron bioensayos de preferencia alimenticia y las larvas de *H. cunea* seleccionaron a BtS/A, Tratamiento 8 con (47.8%) y el BtGG, con (43.1%) como preferidos. A las preparaciones con BT se les determinó actividad insecticida y vida de anaquel, almacenados a diferentes temperaturas, mostrando actividad después de 18 meses, conservando valores por debajo de 0.05 ng de BT/cm<sup>2</sup>. Se determino el grado Suspensibilidad, y el porcentaje de ingrediente activo se mantuvo suspendido, arriba del 90% en un lapso de tiempo de 8 h, en todos los formulados. Los Tratamientos se hicieron pasar atreves de una boquilla de 0.5 µm y 5 lb de presión, esto para determinar la factibilidad de aspersión, y en todos fue positiva esta prueba. El grado de adherencia de los Tratamientos se muestra favorable para el formulado con Goma Xantana, (BtGX), con el mayor peso adherido (16%), arriba del adherente comercial Bionex® (6.6%). En invernadero, se evaluó la persistencia de las formulaciones después de 9 días, con lluvia simulada y sin lluvia, y se observa que BtGX, no mostró diferencias significativas (P > 0.05) tanto en presencia como en ausencia de lluvia. Las formulaciones demostraron ser eficaz para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados en arboles de nuez pequeños, los Tratamientos con BT mostraron ser efectivos para controlarlos, siendo BTGG la formulación más eficiente con una mortalidad observada del 70% después de 24 h.

## ABSTRACT

Pecan farming is of great commercial value, being the United States, Canada and Mexico the main markets for the nuts. Over 600 species of plant hosts have been identified for *Hyphantria cunea*, whose larvae attack leaves of a great variety of trees affecting their productivity, the pecan tree among them. In order to conduct the searching for strains of *Bacillus thuringiensis* (BT) with toxic activity towards this insect, the breeding of *H. cunea* had to be developed in laboratory. The larvae growing conditions in Shorey diet were 70-80 RH, 26-28°C and a photoperiod of 14/10 h. Then 10 native and collection BT strains were tested: HD-1, GM-2, GM-7, GM-10, GM-13, GM-18, GM-33, GM-43 and GM-58, seven of which caused larvae mortalities above 80% and GM-10 result the most lethal strain with CL<sub>50</sub> and TL<sub>50</sub> of 0.007 ng/cm<sup>2</sup> and 80.83 h respectively. The preference assays using leaf powder of Pecan, Mulberry, Texas sage and Medlar and powdered Pecan shells as compared to Coax® as feeding attractants, showed a preference of *H. cunea* larvae for Texas sage (61.4% larvae attracted). Using the Texas sage as a feeding attractant a series of encapsulated formulations based in a mixture of polymers (Capsul®-gelatin) were developed, using guar gum (GG), core gum (CG), xanthan gum (XG) or none (NG) as additives, and a new preference assay was conducted with and without BT in each formulation. Results showed a preference for two combinations BTNG (47.8%) and BTGG (43.1%). Insecticidal activity and shelf life at different temperatures were determined for all BT formulations, which showed activity after 18 months and kept values under 0.05 ng of BT/cm<sup>2</sup>. Suspensibility test indicated that above 90% of active ingredient remained suspended after 8 h in all formulations. In the test to determine the feasibility of spraying, all formulations successfully passed through a nozzle of 0.5µm using 5 lb of pressure. In the adherence test, the formulation BTGX had a better adherence (16%) than the commercial adherent Bionex® (6.6%). In greenhouse, the persistence of formulations was evaluated after 9 days of rain simulation, BTGX formulation showed no significant difference (P>0.05) in persistence in the presence and absence of rain. The formulations demonstrated to be effective to control the pest in already formed webbed nests in small pecan trees, being BT GG the most efficient formulation with an observed mortality of 70% after 24 h.

## INTRODUCCIÓN

*Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae), es un insecto nativo de Norte América, su rango de distribución va desde Canadá (45°N) hasta el Golfo de México (30°N), el número de generaciones varía desde una en el norte a más de cuatro en el sur (Li *et al.* 2001). Cada hembra deposita entre 400 y 500 huevecillos sobre el envés de las hojas, las larvas se alimentan de las hojas formando una telaraña alrededor de ellas de aspecto desagradable y de color blanco sucio, que encierra el follaje en los extremos de las ramas provocando en ocasiones defoliación completa del árbol, afectando su valor estético así como su productividad en el caso de árboles frutales. Se clasifica como una de las plagas invasoras más importantes, ya que posee un amplio rango de hospederos, se estima que la larva puede alimentarse de más de 600 especies de plantas en el mundo, sin embargo, el cenizo, olmo y nogal parecen ser su dieta preferida en América (Worth 1994). El nogal posee importancia comercial por su fruto y su madera (González *et al.* 2010). México ocupa el segundo lugar como país productor de nuez a nivel mundial, la nuez pecanera se cultiva principalmente en los estados de Chihuahua, Coahuila, Durango, Sonora, Hidalgo y Nuevo León. El Estado de Nuevo León ocupa el quinto lugar en producción de nuez, en México con 4,093 hectáreas de superficie y una producción promedio de 1,728 toneladas por año. Provee el 25% de árboles mejorados establecidos en huertos comerciales (Campos *et al.* 2005; González *et al.* 2010). Estados Unidos,

Canadá y México son los principales mercados para la nuez y el Tratado de Libre Comercio con América del Norte (TLCAN), ha eliminado las barreras arancelarias para el producto, lo que ha permitido un mayor dinamismo en la actividad comercial (Camarena y Sanjuán 2005; SAGARPA 2011, 2012). El cultivo del nogal pecanero es atacado por diversas plagas, entre ellas *H. cunea* que causa defoliación grave del nogal, reduce el vigor del árbol y afecta su productividad (Shetlar 2000), en casos extremos al ocurrir una defoliación severa esto conduce a la muerte de los árboles (Worth 1994).

Para el control de esta plaga se utilizan principalmente insecticidas químicos. Entre los pesticidas usados para su control se encuentran el fenitrothin, isoxathion, spinosad, acephate, y carbaryl. Además del daño al medio ambiente y a insectos benéficos que estos productos químicos ocasionan, también se reporta el desarrollo de tolerancia (Yamanaka *et al.* 2001; Klass 2010). Se ha reportado la efectividad de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* para el control efectivo de *H. cunea* (Kati *et al.* 2007; Zibae *et al.* 2010). Esta plaga es considerada como secundaria, sin embargo económicamente importante ya que su control beneficiaría al sector productivo de este tipo de cultivo, el cual podría integrarse al manejo integrado de plagas, contribuyendo con esto a un entorno saludable ecológicamente.

## ANTECEDENTES

### HISTORIA DE *Bacillus thuringiensis*

*Bacillus thuringiensis* ha sido estudiada intensamente en las últimas décadas, y ha demostrado ser apropiada como agente de control biológico de insectos plaga. El interés en este microorganismo principia por el aislamiento de una bacteria de orugas enfermas del gusano de seda (*Bombix mori*), efectuadas por el japonés Shigetane Ishiwata (1905), denominándolo *Bacillus sotto*, pero esta identificación no fue completa y la primera descripción microbiológicamente válida del bacilo fue hecha en Alemania por Berliner (1911) y lo aisló de larvas enfermas de la palomilla del mediterráneo (*Anagasta khueniella*). En 1915 Berliner en Alemania identificó estos aislados como una subespecie nueva y propone el nombre de *B. thuringiensis*, ya que originalmente fue aislada en Berlín en la provincia de Thuringen donde encontró e inició sus estudios con este bacilo (Dulmage y Aizawa 1980; Heimpel y Angus 1963; Lüthy y Ebersold 1981; De Luna 2002).

Un aislamiento similar fue realizado en 1927 por otro alemán, Mattes, quien trabajó con el mismo insecto. Ambos bacteriólogos hicieron observaciones importantes con este microorganismo, mientras células vegetativas crecían y maduraban, éstas producían, además de la espora oval, un segundo cuerpo, y Berliner lo nombró “Restekörper” o cuerpo de desecho, tiempo después un canadiense utilizando el Microscopio Electrónico, redescubrió este cuerpo y confirmó las observaciones anteriores, mientras

examinaba la esporulación en bacterias, observó cristales en forma de diamante libres del esporangio en preparaciones de cultivos esporulados de *B. thuringiensis* y se refiere a ellos como paraesporal. Hasta ese tiempo, se desconocía esto como una función de patogenicidad, sin embargo Hannay en 1953, por el contrario, sugiere que los cristales, al encontrarse en el intestino medio, están conectados con la formación de una sustancia tóxica que induce una posterior septicemia en larvas de insectos (Dulmage y Orlin 1977).

En 1938 en Francia estuvo disponible el primer producto comercial de *B. thuringiensis* llamado Sporeine, el cual no tuvo el éxito esperado ya que unos años más tarde se descubrirían las propiedades bioinsecticidas de moléculas sintéticas y por su restringido espectro de huésped en aquellos años.

Posteriormente Angus en los años del 1953 al 1954 separó el cuerpo paraesporal de la espora en cultivos viejos, y demostró que el cristal contenía una toxina alcalina soluble para insectos y que la toxicidad para el gusano de seda (*Bombix mori*) está en función de éste y requiere para ejercer su efecto encontrarse en el intestino medio anterior del insecto, sitio susceptible a la acción del cristal paraesporal (Dulmage *et al.* 1971; Norris 1987).

Los cristales producidos por *B. thuringiensis* están formados por una o más proteínas llamadas  $\delta$ -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 Lepidóptera, Díptera y Coleóptera (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 (ahora Hemiptera), Orthoptera y Mallophaga y contra nematodos, gorgojos y protozoarios (Schnepf *et al.* 1998).

### **TOXINAS DE *B. thuringiensis***

Pasaron cerca de 50 años desde el aislamiento original de *B. thuringiensis* sin que la acción tóxica de este microorganismo fuera reconocida (Lüthy y Ebersold 1981). Hoy es reconocida por la habilidad que presenta para producir toxinas, y varía de cepa en cepa dependiendo de las condiciones del medio de cultivo (Pendleton 1969).

En las cepas de *B. thuringiensis*, se han descrito 7 toxinas diferentes: Fosfolipasa c ( $\alpha$ -exotoxina), una exotoxina termoestable ( $\beta$ -exotoxina), una enzima no identificada que puede no ser tóxica ( $\tau$ -exotoxina), el cristal de proteína paraesporal ( $\delta$ -endotoxina), una "toxina lábil", una toxina soluble en agua aislada a partir de una formulación comercial y una exotoxina conocida como "factor ratón" (Faust y Bulla 1982).

**$\alpha$ -exotoxina.** Esta toxina (fosfolipasa C o lecitinasa) es producida por *B. thuringiensis* y *B. cereus*, actúa afectando los fosfolípidos en membrana y causando lisis y necrosis. Por su acción sobre la misma, probablemente facilita la penetración de células vegetativas de *B. thuringiensis*, del intestino al hemocele del insecto (Faust y Bulla 1982; Lüthy 1980).

La lecitinasa es una proteína termoestable, su biosíntesis y acumulación ocurre en un rango de pH 6.0-9.0. Se ha demostrado la coincidencia entre el pH óptimo (6.9-7.4) para lecitinasa y el pH dentro del intestino de algunos insectos. Así, la condición alcalina en el intestino de algunos insectos puede ser un factor limitante en el crecimiento del organismo y la actividad lecitinasa (Faust y Bulla 1982).

**$\beta$ -exotoxina.** Ciertas variedades de *B. thuringiensis* reportan ser productoras de una exotoxina ( $\beta$ -exotoxina, factor mosca o exotoxina termoestable) y entre los serotipos productores de ésta toxina se encuentran; 1, 5a5b, 5a5c, 7, 8a8b, 9, 10 y 11a11b de *B. thuringiensis* (Faust y Bulla 1982). La  $\beta$ -exotoxina es un producto que se caracteriza por ser estable al calor excretado al medio durante la fase de crecimiento vegetativo, soluble en agua y dializable, absorbe a 260 nm y de estructura nucleotídica, y su estructura química está compuesta por adenina, ribosa, glucosa y ac. alárico con un grupo fosfato (Lüthy y Ebersold 1981; Norris 1987; Pendleton 1969; Prasad y Shethna 1976). Su actividad teratogénica se ha demostrado en insectos, en los cuales produce deformaciones físicas en la emergencia de las larvas, en mudas y durante la metamorfosis. Actúa inhibiendo la síntesis de ARN, resulta por lo anterior un compuesto altamente tóxico (Faust y Bulla 1982; Richards 1961).

**$\tau$ -exotoxina.** Es una enzima sin estar identificada, responsable del aclaramiento del agar yema de huevo, con indeterminada toxicidad y presencia en la naturaleza (Faust y Bulla 1982).

**$\delta$ -endotoxina.** Es considerada la de mayor importancia en Biotecnología, ya que la actividad insecticida de *B. thuringiensis* se basa en la  $\delta$ -endotoxina, ésta se forma durante el proceso de esporulación dentro de la célula vegetativa, al mismo tiempo que la espora, la  $\delta$ -endotoxina es producida y aparece como una inclusión cristalina, considerándose una característica constante de las especies de *B. thuringiensis* (Couch y Ross 1980; Faust y Bulla 1982; Lüthy 1980). A esta inclusión se le adjudican algunos sinónimos como: Cuerpo paraesporal, cristal de proteína o solamente cristal. Aunque es denominado así a todo el cuerpo paraesporal, solo la porción activa dentro del cristal debe ser considerada  $\delta$ -endotoxina. En 1976 Bulla y colaboradores, determinaron que el cristal es una glicoproteína, sin demostrarse su actividad biológica, y proponen que su esta ocurre bajo condiciones naturales por proteasas del intestino del insecto hospedero (Lüthy 1980).

El cuerpo paraesporal mide en tamaño, cerca de un tercio de la espora (30% del peso seco del esporangio y largo como la espora 1 $\mu$ m), además de ser una característica constante en las especies de *B. thuringiensis* y única diferencia entre éste y *B. cereus* (Lüthy 1980), por otra parte se han

clasificado los genes que codifican las proteínas de incisión cristalina de la  $\delta$ -endotoxina (Hofte y Whitley 1989).

Otras exoenzimas producidas por *B. thuringiensis*, con propiedades insecticidas o enzimas donde también reside su patogenicidad son: Quitinasa; otra enzima que daña la membrana peritrófica, facilita el acceso de la  $\delta$ -endotoxina o bacterias al epitelio del intestino. Proteasa; enzima proteolítica extracelular, asociada con el inicio de la esporulación y obligatoria para el completo éxito del proceso. Todas ellas expresan su acción en combinación con la  $\delta$ -endotoxina y la  $\beta$ -exotoxina (Lüthy 1980).

## **MODO DE ACCION**

La infección por *B. thuringiensis*, comienza en el estadio larval por ingestión del alimento. La  $\delta$ -endotoxina es una protoxina, que es hidrolizada por enzimas que intervienen en el proceso de ingestión, en combinación con el pH alcalino del intestino medio, donde actúa y causa destrucción del epitelio, lo cual provoca una parálisis y el insecto deja de ingerir alimento (Couch y Ross 1980).

La acción específica de la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* se basa principalmente en tres factores, que determinan su potencia y son: La variedad, la cual produce cierto tipo de cristal, y el modo de activación del mismo por proteasas del jugo intestinal en donde la protoxina se transforma en la  $\delta$ -endotoxina y el tipo de células epiteliales del intestino, que actúan

como blancos para la toxina activada (Palacios 1993). Se describen los síntomas del modo de acción de *B. thuringiensis*: Parálisis general; observada en las larvas del gusano de seda *B. mori*, después de la ingestión de cultivos esporulados de las serovariedades *sotto*, *alesti* o *thuringiensis*. El desarrollo de ésta parálisis es rápida y acompañada por un incremento progresivo en la alcalinidad de la hemolinfa, separándose las células unas de otras y de la membrana basal, los músculos circulares y longitudinales se relajan y cesan sus movimientos peristálticos normales (Heimpel y Angus 1959; Stanbury y Wotaker 1984). Parálisis intestinal; los síntomas notados por otros investigadores en un rango amplio de lepidópteros infectados con variedades de *B. thuringiensis*, revelan que ocurre una inactividad en la larva, deja de alimentarse, se observan vómitos y diarreas, no ocurre parálisis rápida y general como en *B. mori*. Mediante rayos X se demostró que el intestino de larvas infectadas presenta un cese en sus funciones; la muerte se presenta en 24 a 48 h (Heimpel y Angus 1959).

En un estudio del efecto de la proteasa digestiva, presente en el jugo del intestino del gusano de seda *B. mori* sobre la  $\delta$ -endotoxina, reveló que para la disolución del cristal requiere valores del pH de 10.0 y 11.0, y sugieren que causa el hinchamiento de los cristales y en seguida la disolución por la proteasa (Tojo y Aizawa 1983).

Se hicieron bioensayos en mosquitos adultos de *Aedes aegypti* con *B. thuringiensis* var. *israelensis*, utilizando cristales intactos y solubilizados y reportaron buenos rendimientos de toxicidad para el cristal intacto en larvas

y el cristal solubilizado en adultos, y no tienen explicación de la gran actividad que presenta este último. Además, reportan baja potencia para larvas cuando es solubilizado el cristal y proponen que es debido a la forma de alimentación de la larva que puede ingerir menos componente activo cuando el cristal se ha solubilizado (Klowden *et al.* 1983).

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.* 1993). Por otra parte ciertos insectos tienen una baja susceptibilidad para los cristales de *B. thuringiensis*, esto debido a la ineficiente solubilización de los mismos en el intestino de las larvas (Höfte y Whiteley 1998). Entre los factores que pueden influir en el rango de hospedero del cristal de proteína son, la presencia de sitios específicos de unión de la toxina o receptores, en el intestino de los diferentes insectos y por otro lado las diferencias en el intestino de la larva que afectan la solubilización y/o la eficiencia del proceso de la protoxina. En otros estudios sugieren que los receptores en las 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).

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 la protoxina no pueda continuar los pasos subsecuentes, como se observó en *Spodoptera litura* donde el jugo intestinal degradó completamente la toxina (Inagaki *et al.* 1992). Otro caso es el de la mosca *Musca domestica* donde el 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 resistencia es una disminución en la susceptibilidad con bases genéticas de una población a un insecticida, es por definición un fenómeno evolutivo. El mecanismo principal de resistencia que ha sido identificado, es la reducida unión de la toxina de *B. thuringiensis* a las vesículas de la membrana de las microvellosidades apicales del epitelio del intestino medio, como en el caso de *Plodia interpunctella* y *Plutella xilostella*, en los cuales se ha observado ese fenómeno (Tabashnik *et al.* 1994), en pruebas de laboratorio y en campo es causada por plantas transgénicas (Bolin *et al.* 1999; Venette *et al.* 2000), quizá por las alteraciones en las proteínas de unión o la reducida conversión de protoxina a toxina (Lee *et al.* 1995). Sin embargo a nivel de laboratorio se ha podido inducir resistencia en *Spodoptera exigua*, *Heliothis virescens* (Gould *et al.* 1995; Lee *et al.* 1995), *Ostrinia nubilalis* (Bolin *et al.* 1999; Venette *et al.* 2000) y *Lymantria dispar* (Rossiter *et al.* 1990).

## **FORMULACIONES**

El principal objetivo de una formulación es proveer la combinación correcta de ingredientes de tal manera que el ingrediente activo junto con otros materiales forme un producto seguro, efectivo, fácil de aplicar, con una larga vida de anaquel, así como extender su viabilidad en el ambiente y permanecer en condiciones ideales por un periodo de 2 años. Sin embargo el desarrollo de cepas efectivas es una barrera menor comparada con una formulación perfecta y el diseño de los métodos de aplicación más adecuados (Connick *et al.* 1989; Rhodes *et al.* 1990). Estas han tenido que ser ampliamente mejoradas debido a que el comportamiento de los insectos es un fenómeno complejo. Se han realizado 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.

## **ASPECTOS BÁSICOS DE LAS FORMULACIONES**

Se distinguen tres clases de componentes para formular agentes de control: Principio activo, Disolventes o diluyentes y Adyuvantes o aditivos.

La materia o principio activo responsable de la actividad; constituido por organismos vivos (células, esporas, partículas virales) los cuales pueden

ser capaces de replicarse en el medio ambiente, en algunos casos es necesaria su multiplicación después de la aplicación para llevar a cabo el control de la plaga, patógeno o maleza. Los agentes de control biológico pueden suspenderse en fluidos, pero no pueden ser disueltos sin perder su actividad. Cuando el modo de acción es por parasitismo o competencia la formulación debe mantener viable y activo al agente de control biológico y algunas veces es necesario que la formulación provea los nutrientes y condiciones ambientales necesarias para la multiplicación del mismo (Rhodes 1993; Couch e Ignoffo 1981; Boyette *et al.* 1996).

Disolventes o diluyentes que actúan como vehículos de la materia activa, sean sólidos o líquidos; usados para formular, incluyen derivados de fuentes naturales, minerales y sintéticas. Para la elaboración de formulados como polvos humectables y para espolvoreo se utilizan tierras inertes de muy distintas clases como, talcos, arcillas, kaolines, bentonitas, tierra de diatomeas, atapulgita, silicatos, harinas de diferentes clases, etc. En la selección del soporte más adecuado hay que tener en cuenta la estabilidad del principio activo en el mismo, por lo que es importante el pH de la materia inerte que se emplea así como su capacidad de absorción de agua, propiedades de intercambio iónico y tamaño de partícula. El objeto de estos soportes es diluir el principio activo en formulaciones sólidas ya sean humectables o para espolvoreo (Angus y Lüthy 1971; Lewis 1983). En formulaciones líquidas se utilizan disolventes, entre los disolventes más empleados y cuyo uso práctico y extenso ha demostrado que son inocuos a la

vegetación, incluso a dosis relativamente altas, se encuentran: Xileno, derivados del petróleo, ciclohexanona, dimetilformamida, alcohol como etílico, isopropílico, butílico, etc. También se emplean como disolventes los aceites minerales, aunque su uso no es general debido a que en forma continua pueden causar daño a las plantas (Angus y Lüthy 1971; Barbera 1976; Smirnoff y Hutchison 1965). En la elaboración de formulados como granulados o asperjables se pueden utilizar polímeros naturales, la ventaja de estos como soportes de formulación, es que los residuos del polímero son biodegradables y no permanecen en el ambiente por mucho tiempo. Los principales tipos de polímeros utilizados para elaborar formulaciones biodegradables incluyen: almidón y amilosa, derivados de celulosa, quitina, quitosan, Ac. algínico, carragenanos, gomas, dextran, agar, agarosa, proteínas como caseína, albúmina, queratina, gelatina, colágeno, fibrinógeno, deshechos de cuero, lignina y lignocelulosa, Ac. húmico, cera, corcho, taninos, polihidroxitirato, polihidroxitirato, poliacetato, pliamina, poliacrilamida, alcohol polivinílico, polilactato (Couch e Ignoffo 1981; Wilkins 1990).

Los adyuvantes o aditivos: son el tipo de sustancias más 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). Los adyuvantes o aditivos, igualmente inertes, ayudan a optimizar la actividad del principio activo, mejoran las características del producto formulado durante su aplicación, aumentan su persistencia en el medio ambiente o

mejoran su propia acción, reteniendo su integridad física y estabilidad durante el proceso de aplicación.

Algunos tipos de adyuvantes podrían ser agentes tensoactivos o surfactantes; que afectan las interacciones fisicoquímicas en las formulaciones, son productos dotados de la propiedad de bajar la tensión superficial de los líquidos contribuyendo así a la formación de emulsiones, humectación y esparcimiento del principio activo (Lewis 1983; Sawicka y Couch 1983), los humectantes retardan la desecación durante el asperjado. Algunas sustancias tienen más de una función (Morales-Ramos 1993; Salama y Morris 1993).

Adherentes; que aseguran la permanencia del plaguicida una vez aplicado evitando su arrastre por lluvia, rocío o incluso vientos, se adhieren a superficies de hojas formando una película protectora, espesantes que pueden reducir la evaporación, a tal tipo pertenecen la gelatina, dextrina, albúmina, caseína, gomas diversas, carragenanos, etc. Otros materiales probados en el laboratorio como adherentes y asperjantes, son harina de trigo, Triton® B-1956, una mezcla de gelatina y oleato, leche en polvo, metilcelulosa y varios agentes humectantes. En general estos materiales mejoran la actividad de los patógenos (Jaques y Fox 1960).

Agentes de suspensión o dispersantes; sirven para favorecer la suspensibilidad de los polvos humectables, estos agentes actúan normalmente elevando ligeramente la viscosidad del agua que funciona de vehículo retardando así la caída de la partícula, por ejemplo gomas,

caseínatos, albúminas, carragenanos, almidón, metil celulosa, alcohol polivinílico, sulfonatos de lignina y naftaleno, también se emplean sustancias sintéticas (Jaques y Fox 1960).

Amortiguadores; usados en casos concretos, aseguran el pH de la solución o del producto formulado y que se mantenga en los límites convenientes, para evitar descomposición del principio activo debido a pH excesivamente alto o demasiado bajo (Couch 1978).

Estabilizantes; para formulaciones sólidas e impedir descomposiciones del principio activo cuando entra en contacto con la materia inerte, ya que pueden inducir degradación por presencia de puntos ácidos ejemplos de estos están las aminas, glicoles, fenoles, polímeros, etc. (Angus y Lüthy 1971).

Fotoprotectores; se utilizan como protectores de luz UV, existen muchos compuestos, como San-285, Melazas P/yac, Lufilm, Triton X-100, ADWNP 66 , carbón activado y colorantes como rojo congo, verde de malaquita, etc. (Couch 1978).

Entre otros aditivos están: Agentes atrapantes; que hace que los insectos se pongan en contacto con él. Estimulante de la locomoción; por un mecanismo cinético, hace que el insecto se disperse desde una región, más rápidamente que si el área no lo tuviera, este efecto puede incrementar la velocidad de locomoción. Atrayente; hace que el insecto tenga movimientos orientados hacia su fuente. Repelente; hace que el insecto se aleje de su fuente. Estimulante; favorece o ayuda a la ovoposición, el cruzamiento o la alimentación. Estimulante alimenticio es sinónimo de fagoestimulante.

Inhibidor; bloquea la alimentación o la ovoposición cuando está presente en un lugar, donde los insectos en su ausencia podrían alimentarse y ovopositar normalmente (Dethier *et al.* 1960). Estos inhibidores alimenticios se han estudiado debido a la característica de 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 Rídgway 1994).

### **FORMULACIONES CON *B. thuringiensis***

Las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, las cuales actúan exclusivamente por ingestión, han adquirido un inusitado protagonismo en el campo de la sanidad vegetal, por 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), estudios revelan que la vida media de diferentes especies de entomopatógenos (bacterias, virus hongos y protozoarios) expuestos a la luz solar es menor de 4 horas (Ignoffo *et al.* 1977; Ignoffo y García 1978). La vida media para *B. thuringiensis* se ha estimado en 3.8 h cuando se expone a una fuente de luz UV, equivalente a la luz solar natural. Una variedad de respuestas al espectro UV se ha observado para *B. thuringiensis*, inactivación de las esporas a 330 nm (Griego y Spence 1978), la causa de esta fotoinactivación a nivel de campo, se atribuye la generación de radicales peróxido de hidrógeno debido a la fotoxidación de uno o más de los aminoácidos (Ignoffo y García 1978). El espectro de actividad de 290-400 nm de la radiación ultravioleta es el factor más destructivo (Ignoffo *et al.* 1997). De 400-425 nm hay producción de compuestos de coproporfirina e inactivación del cristal después de 40 h de exposición a la radiación UV, causando una destrucción del 80% de los residuos de triptofano y 20% de los residuos de histidina, lo que supuestamente produce un cambio en la configuración tridimensional de la toxina y consecuentemente la pérdida de actividad tóxica (Harms *et al.* 1986; Pozsgay *et al.* 1987). 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 tiene una influencia negativa en la viabilidad de las esporas (Leong *et al.* 1980).

Por este motivo el uso de diferentes aditivos para protegerlo de la energía UV de la luz solar, es una práctica común. Se han utilizado como fotoprotectores, compuestos como leche peptonizada, extracto de levadura, quitina, y albúmina de huevo (Salama y Morris 1993), algunos colorantes como, rojo congo, verde de malaquita, etc. así como carbón activado, en formulados para plagas agrícolas (Dunkle y Shasha 1988). El rojo congo ha dado magníficos resultados ya que tiene una absorbancia excelente en un rango de 280-400 nm, 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 a base de gelatina, pectina o almidón (Morales-Ramos *et al.* 2000).

Las preparaciones concentradas de *B. thuringiensis* pueden ser polvos o gránulos humectables, líquidos, emulsiones, etc. las cuales se deben mezclar fácilmente con agua, estar libres de grumos y ser homogéneas. El comportamiento de sedimentación y distribución sobre la superficie de la planta está fuertemente influenciado por el tamaño de partícula. Los tamaños de partícula encontrados en formulaciones de *B. thuringiensis* comerciales y experimentales van de 3 $\mu$ m a 25 $\mu$ m. La concentración de  $\delta$ -

endotoxina en los productos comerciales está entre 0.3% y 1.7 % (Bernhard y Utz 1993; Pristavko 1965; Angus y Liithy 1971; Lambert y Peferoen 1992). Con los productos comerciales de *B. thuringiensis*, los rangos de aplicación son de 0.5 Kg a 2 Kg por hectárea. Dependiendo del cultivo y modo de aplicación, en suelo o aplicación aérea, los volúmenes de aplicación varían entre 10 y 100 litros por hectárea.

Investigaciones sugieren que las larvas de lepidópteros, cesan su alimentación sobre el follaje tratado, antes de recibir una dosis letal de *B. thuringiensis*, esto afecta su eficacia y la variabilidad de estos resultados comparados con los obtenidos para insecticidas sintéticos. (Aranson *et al.* 1986; Rombach *et al.* 1989; Dulmage y Martinez 1973; Hough-Goldstein *et al.* 1991). Estudios sugieren que un incremento en la aceptabilidad de *B. thuringiensis* puede reducir la variabilidad y mejorar el nivel de control de las plagas blanco. Para incrementar el consumo de bioinsecticida por parte del insecto, se adicionan feromonas (atrayerentes sexuales) (McGuire y Shasha 1992) o fagoestimulantes, el más comercializado es el Coax® (producto de CCT, Litchfield Park, Ariz.), una mezcla de harina de semilla de algodón, azúcar, aceite de semilla de algodón y Tween 80 (Bell y Romine 1980), ya que además de cumplir como atrayente alimenticio, muestra cierto efecto protector contra los rayos UV, (Moffat 1991; Bartelt *et al.* 1990; McGuire *et al.* 1990; McGuire *et al.* 1994; Gillespie *et al.* 1994).

Avances en el establecimiento de metodologías con el fin de seleccionar fagoestimulantes adecuados, han demostrado su utilidad en las

formulaciones (Guerra y Shaver 1968; Bartelt *et al.* 1990), debido a que la palatabilidad es un factor muy importante cuando el entomopatógeno tiene que ser ingerido para ser efectivo (Guillespie *et al.* 1994). Estudios demostraron la efectividad como fagoestimulante al utilizar extracto acuoso de grano de maíz, y 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 (Guerra y Shaver 1968; McMillian *et al.* 1968).

Observaciones con el uso de hojas de algodón y el Coax® mostraron que son fagoestimulantes ampliamente aceptados por las larvas de *Ostrinia nubilalis*, además la melaza usada como fagoestimulante causa una palatabilidad intermedia y aquellas formulaciones que contenían CaCl<sub>2</sub> fueron totalmente rechazadas por este insecto (Guillespie *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.* 1990; Rosas-García *et al.* 2009). Aparte del Coax® existen algunos otros de tipo comercial como Pheast®, Gustol®, 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 (Fanan y Ridgway 1994). El Coax® y el Gustol® tuvieron un claro efecto en la mortalidad de *Heliothis sp* (Johnson 1982). 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). 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, 2000b).

Actualmente, una gran variedad de bioinsecticidas basados en *B. thuringiensis* está disponible comercialmente para el control de una amplia variedad de plagas agrícolas y forestales, incluyendo enfermedades con vectores. Muchas formulaciones ya existen en el mercado, sin embargo, muchas patentes se refieren a la utilización de diferentes componentes que puedan mejorar aún más su actividad insecticida. En muchos casos, estos productos ofrecen interesantes ventajas sobre insecticidas previamente desarrollados. La Tabla 1. muestra la cantidad de la propiedad intelectual desarrollada para *B. thuringiensis* alrededor del mundo durante los últimos años (Rosas-García 2009).

Tabla 1. Bioinsecticidas más comunes comercialmente basados en *B. thuringiensis*.

Compañía	Nombre Comercial	Ingrediente Activo	Insecto Blanco
Certis	Agree WG	<i>B. thuringiensis v. aizawai</i>	Lepidópteros
Certis	Condor	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	CoStar	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	Crymax	Cepas de BT genéticamente enriquecidas de <i>Bt v. kurstaki</i> y <i>Bt v. aizawai</i>	Lepidópteros
Certis	Deliver	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	Jackpot WP	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	Javelin/Delfin	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	Lepinox WDG	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Certis	Turix WP/Agree WP	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
AFA Environment Inc.	Agribac	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Más de 30 especies de insectos
Valent Biosciences Corp.	DiPel	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Valent Biosciences Corp.	XenTari	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Efectivo contra <i>Spodoptera ssp.</i> y <i>Plutella xilostella</i>
Valent Biosciences Corp.	Biobit	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Valent Biosciences Corp.	Novodor	<i>B. thuringiensis v. tenebrionis</i>	Coleópteros
Valent Biosciences Corp.	VectoBac	<i>B. thuringiensis v. israelensis</i>	Larvas de Mosquito
Valent Biosciences Corp.	Teknar	<i>B. thuringiensis v. israelensis</i>	Larvas de Mosquito y de Mosquita negra
Valent Biosciences Corp.	GnatrolDG	<i>B. thuringiensis v. israelensis</i>	Larvas de moscas de scáridos de hongos
Valent Biosciences Corp.	Foray	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros
Valent Biosciences Corp.*	Thuricide	<i>B. thuringiensis v. kurstaki</i>	Lepidópteros y ciertos larvas cortadoras de hojas

(Adaptado de Rosas-García 2009)

## FORMULACIONES MICROENCAPSULADAS

La microencapsulación es definida como una tecnología por la cual pequeñas partículas de material sólido, líquido o gaseoso (corazón, ingrediente activo) son cubiertas por una película delgada de material protector (matriz, sello, cubierta o pared) puede ser delgada o conformada por varias capas. La película o pared protege al ingrediente activo contra el deterioro y lo libera. (Shahidi y Han 1993).

Se han elaborado formulados microencapsulados con Mira-sperse® como matriz y sacarosa proporción 6% de sólidos totales, los cuales se aplicaron en forma líquida por aspersion (McGuire y Shasha 1990); de esta forma se logró una residualidad de 2 semanas, contra 2-4 días cuando se microcapsularon.

*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* en forma libre, pierde su efectividad cuando se utiliza en aguas contaminadas debido a degradación física y química de la toxina y pérdida del contacto potencial con el insecto blanco debido a su rápida sedimentación, por lo que se probó a *B. thuringiensis* var. *israelensis* H-14 microcapsulado en polietileno, logrando incrementar fuertemente su eficacia y persistencia contra *Aedes aegypti* (Margalit *et al.* 1984; Zomer *et al.* (1989), describieron la microcapsulación de la toxina de *B. thuringiensis* en un material resinoso polimérico, permeable a las enzimas digestivas del insecto, de esta forma se mejoró la estabilidad de la toxina, además es posible adicionar aditivos y feromonas

para incrementar la probabilidad de que el insecto ingiera la toxina (Morales-Ramos 1996).

Gelernter y Zehnder en 1989, utilizaron microorganismos transformados con la toxina de *B. thuringiensis* y desarrollaron dos productos basados en el sistema M-Cap®, que consiste en transferir el gen responsable de la producción de la  $\delta$ -endotoxina a *Pseudomonas fluorescens*. Al final de la fase de crecimiento las células de *Pseudomonas* se inactivan con calor y un tratamiento químico, de esta forma la pared celular sirve como una microcápsula protectora que encierra la toxina de *Bacillus thuringiensis*. Se desarrollaron dos productos M-Cap® y MVp® que poseen la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* y M-One® que posee la  $\delta$ -endotoxina de *B. thuringiensis* var. *san diego* (Morales-Ramos 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 muy bien cuando se trata de cultivos de campo (McGuire *et al.* 1994). Se han desarrollado formulaciones de *B. thuringiensis* asperjables y con características adherentes, utilizando diferentes tipos de almidón de maíz pregelatinizado y adyuvantes, logrando formar una película con el plaguicida encapsulado sobre la superficie de la hoja. Esta película puede durar de 1 a 21 días en condiciones de invernadero dependiendo del tipo de almidón pregelatinizado y de los otros componentes utilizados. (McGuire y Shasha 1990). Este polímero, el almidón de maíz, se ha utilizado con éxito para estas formulaciones, ya que 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, están restringidas a usarse en el cogollo del maíz, o en la superficie del suelo para el control de plagas de esta área (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).. 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.

## **FORMULACIONES Y PRINCIPIO ACTIVO**

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.

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  $\delta$ -endotoxinas presentes en varias cepas nativas 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  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis*, los cuales se conocen como CellCap®, y estos son producidos por la compañía Mycogen (Cerón 2001; Sauka y Benintende 2008).

## **RECUPERACIÓN DEL INSECTICIDA**

Una etapa importante en la producción de insecticidas biológicos es la recuperación del complejo espora-cristal, es la eliminación de agua, manteniendo la preservación del producto durante un almacenamiento prolongado. El procedimiento de deshidratación es necesario para reducir la humedad final del ingrediente activo, lo cual nos permite limitar el crecimiento de otros organismos y otras reacciones indeseables, además de la deshidratación, la significativa reducción del volumen del producto nos proporciona eficiencia en el transporte y almacenamiento del producto. El primer método para obtener concentraciones estables y secas del complejo espora-cristal en el laboratorio fue la liofilización, pero frecuentemente se tenían significativas pérdidas de esporas y cristales. Un método más satisfactorio para obtener materiales liofilizados involucra la utilización de suspensiones de lactosa con el complejo. Sin embargo, la liofilización no fue ampliamente aceptada debido al gran volumen de líquido involucrado,

mismo que finalmente resulta bastante difícil y costoso (Dulmage *et al.* 1970).

La acetona, considerada como un precipitante de las proteínas, fue utilizada para recuperar células bacterianas y esporas de concentrados acuosos, lo cual resultó un posible sustituto, sin embargo, el producto fue después apelmazado y difícil de resuspender. Por lo tanto se modificó el proceso de precipitación de acetona para hacerlo más adecuado a la recuperación del complejo spora-cristal de *B. thuringiensis*, utilizándose lactosa; el apelmazamiento fue reducido suspendiendo el complejo concentrado en soluciones de lactosa y precipitando la lactosa con el complejo por la adición de acetona, el precipitado fue fácilmente recuperado como una preparación seca y estable, y sin presentar dificultad para resuspenderlo en agua (Dulmage *et al.* 1970).

Sin embargo, este proceso de precipitación es utilizado en recuperación de pequeña escala, resulta impráctico cuando se trata de recuperación a niveles más grandes (piloto o industrial), por el costo de acetona empleada, una solución a este problema fue mediante la utilización de un método que consiste en dos etapas, la primera de ellas por medio de una separación mecánica como lo es la centrifugación y la segunda mediante un proceso térmico como es el secado por aspersion. Este tipo de secado fue adaptado a fluidos con un alto contenido de humedad y que son sensibles al calor.

El proceso de secado por aspersión es considerado como un proceso de deshidratación, el cual es usado como un método de encapsulación, donde se atrapa el material activo dentro de una matriz protectora de un polímero (Okos y Narsimham 1990). Los procesos de encapsulación son capaces de reducir la cantidad de ingrediente activo, de tal forma que se obtenga una eficiencia mayor. Este proceso permite llevar a cabo la liberación sostenida del ingrediente activo por un periodo de tiempo (Shahidi y Han 1993). Estas microcapsulas pueden ser desde submicrón hasta varios milímetros en tamaño y son idealmente esféricas, aunque su forma está fuertemente influenciada por la estructura original del material de encapsulado. Las microcapsulas tienen la habilidad de preservar una sustancia en su estado finamente dividida hasta que se requiera su liberación. El secado por aspersión es especialmente ventajoso para productos termosensibles, ya que las partículas nunca están sujetas a una temperatura alta, más que la del bulbo húmedo del aire de secado, y además, el tiempo de residencia es corto, generalmente entre 3 y 15 segundos (Morales-Ramos 1996; Sánchez 1996, Okos y Narsimham 1990). La anterior situación permite el uso de altas temperaturas sin causar daño al producto (Medrano *et al.* 1989).

## **EL MERCADO DE LOS BIOPESTICIDAS**

El mercado agroquímico mundial informó ser de \$ 37,9 mil millones de dólares en 2009, y bioplaguicidas representan aproximadamente el 3.5% del mercado global de plaguicidas (\$ 1.6 mil millones en 2009) (Tabla 2). Por

ejemplo, el valor de los bioplaguicidas en los mercados europeos de América del Norte y del Oeste se estimó en 594,2 millones dólares en 2008, y la demanda se prevé a casi el doble para el año 2015 y a un valor de mercado de 1020 millones dólares. Está claro que el mercado de bioplaguicidas está creciendo rápidamente (15.6% compuesto tasa de crecimiento anual) y se espera que crezca a alrededor de 7.7% de la mercado global de agroquímicos para el año 2014 (3,3 millones de dólares). El mercado mundial está dominado por los productos a base de bacterias (Tabla 2). Alrededor del 50% de los bioplaguicidas se utilizan en los árboles y los cultivos hortícolas, 30% sobre el pastoreo y la tierra seca, con el restante 12% en cultivos de campo. Independientemente de las discrepancias de los tamaños estimados de mercado para los bioplaguicidas, todo indica que el crecimiento es considerablemente más alto que la prevista para el mercado de plaguicidas sintéticos (Glare *et al.* 2012).

El descubrimiento de nuevos pesticidas sintéticos se ha vuelto cada vez más difícil y costoso. Se estima que las empresas deben detectar al menos 140,000 productos químicos para encontrar un pesticida sintético nuevo, comercialmente aceptable.

Tabla 2. Estimación total del mercado mundial para todo tipo de biopesticidas (incluyendo productos bioquímicos), hasta el año 2014 (millones de dólares)

Producto	2008	2009	2014	% Tasa de crecimiento 2009-2014
Bacteria	893,6	1194,3	2516,5	16,1
Hongos	113,3	150,6	288,9	13,9
Predadores	98,4	128	247,2	14,1
Virus	60,1	80	155,5	14,2
Otros <sup>a</sup>	34,6	47,1	91,9	14,3
Total	1200,0	1600,0	3300,0	15,6

<sup>a</sup> Incluye protozoos, nematodos.  
Tomado de Glare *et al.* 2012

El descubrimiento de nuevos clientes potenciales químicos ha disminuido desde el año 2005 y cada vez es más difícil de convertir un nuevo indicio en un lanzamiento de producto, indicado por el fuerte descenso de los lanzamientos de nuevos productos 2002-2010 (Figura 1.). Ahora requiere más de 250 millones de dólares para desarrollar un nuevo pesticida sintético (Figura 2.), y lleva 10 años, por lo tanto, un menor número de nuevos ingredientes químicamente activos se pondrán en marcha en los próximos 10 a 20 años. Por el contrario, el coste de desarrollar un biopesticida es del orden de 3-5 millones de dólares y tarda aproximadamente 3 años para llegar al mercado en los EE.UU. (Marrone 2011). La razón principal de esto es que un bioplaguicida comercial puede ser descubierto mediante el cribado de muchos microorganismos, menos que el número de moléculas necesarias para hacerse pruebas para un pesticida sintético. Por ejemplo, *B. subtilis*

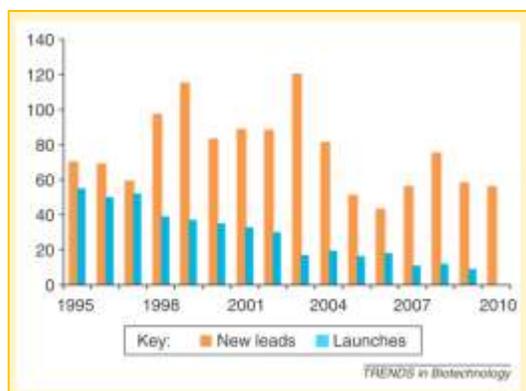


Figura 1. Número de nuevos productos químicos contra el número de productos plaguicidas sintéticos lanzados 1995-2010. (Glare *et al.* 2012).

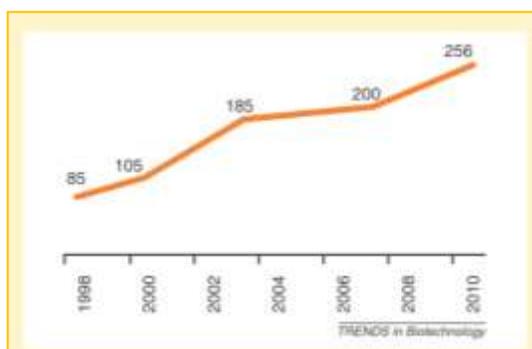


Figura 2. Aumento de costos en millones de dólares, en el tiempo para desarrollar un nuevo pesticida químico. (Glare *et al.* 2012).

cepa 713 (Serenade®) y *Bacillus pumilus* cepa 2808 (Sonata®) se utiliza para el control de enfermedades fúngicas de plantas, fueron descubiertos después del cribado de 713 y 2.808 cepas microbianas, respectivamente. Muchos biopesticidas comerciales se dirigen a una sola plaga importante, que por lo general limita su potencial tamaño del mercado. Por ejemplo,

Contans®, basado en el hongo *Coniothyrium minitans*, su objetivo, sólo un solo género de patógenos (*Sclerotinia* spp.) y Bioshield™, basado en la bacteria *Serratia entomophila*, controla sólo una única plaga de insectos. Para fomentar el uso generalizado de biopesticidas, hay una necesidad de productos con actividad contra varias plagas. Los productos basados en la bacteria *B. thuringiensis* han logrado una incursión excepcional del mercado debido a su capacidad para matar a un rango de especies de plagas de invertebrados (Glare *et al.* 2012).

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 esporas y cristales y la cepa HD-1 ha sido muy utilizada para el control de plagas agrícolas y forestales.

## **IMPORTANCIA DEL NOGAL**

El nogal pecanero (*Carya Illinoensis*) está considerado como nativo de la franja norte de México y Sureste de los E.U.A. Se cultiva prácticamente sólo en "El Cinturón del Sol" de Estados Unidos Meridional y en "La Faja Nogalera" del norte de México que comprende los estados de Sonora,

Chihuahua, Coahuila, Nuevo León y Durango. Se encuentra distribuido en forma silvestre a lo largo de la mayoría de los arroyos y cauces de los ríos del sur de Estados Unidos de América (EU) y norte de México. El Estado de Nuevo León se puede dividir en tres zonas productoras: la zona norte, comprende los Municipios de Bustamante, Ciénega de Flores, Sabinas Hidalgo, Villaldama y El Carmen. En el Centro del Estado están los Municipios de Rayones, General Terán, Montemorelos, Allende y García y en la región Sur se ubican los Municipios de Aramberri, Galeana y Zaragoza. La producción de nogal se realiza principalmente en estos 13 municipios, ya que el cultivo se ha adaptado a las condiciones de suelo, agua y clima que esta región ofrece para la producción de nuez. No obstante, el 61% de la producción de nuez se concentra en los municipios de Bustamante, Rayones, El Carmen y García. La distribución comercial de las plantaciones de este frutal se extienden en los Estados Unidos desde el suroeste de Ohio hasta Kentucky y Alabama, mientras en México se distribuyen principalmente en el noreste, extendiéndose hacia el centro y sur del país, siendo los principales estados productores de nuez: Chihuahua, Coahuila, Durango, Sonora, Hidalgo y Nuevo León. El cultivo del nogal es sumamente dependiente del cuidado del hombre, ya que requiere de riego (González *et al.* 2010).

Estados Unidos, Canadá y México son los principales mercados para la nuez y el Tratado de Libre Comercio con América del Norte (TLCAN), ha eliminado las barreras arancelarias para el producto, lo que ha permitido un mayor dinamismo en la actividad comercial (Camarena y Sanjuán 2005;

SAGARPA 2011, 2012). El cultivo del nogal pecanero es atacado por diversas plagas, entre ellas *H. cunea* que causa defoliación grave del nogal, reduce el vigor del árbol y afecta su productividad (Shetlar 2000), en casos extremos al ocurrir una defoliación severa esto conduce a la muerte de los árboles (Worth 1994). Para el control de esta plaga se utilizan principalmente insecticidas químicos. Entre los pesticidas usados para su control se encuentran el fenitrothin, isoxathion, spinosad, acephate, y carbaryl. Además del daño al medio ambiente y a insectos benéficos que estos productos químicos ocasionan, también se reporta el desarrollo de tolerancia (Yamanaka *et al.* 2001; Klass 2010). La implementación de tecnología, dirigida principalmente al procesamiento y manejo post-cosecha, ha permitido a los productores mexicanos incursionar cada vez más en los mercados internacionales, donde cerca de un 80% de la nuez se comercializa sin cáscara (SAGARPA 2012).

## **IMPORTANCIA NUTRICIONAL DE LA NUEZ PECANERA**

Rica en ácidos grasos mono y poli insaturados, como los Omega 3 y Omega 6, mismos que tienen funciones protectoras en la prevención de coágulos de sangre y reducen el riesgo de cardiopatía coronaria, además contribuyen en el desarrollo normal del sistema nervioso, la nuez pecanera, al mismo tiempo, es fuente de proteína rica en arginina, fitoesteroles y compuestos fitoquímicos, contiene vitamina E, vitaminas del Complejo B y Hierro. Estudios realizados han demostrado un poder incluso superior a los

aceites monoinsaturados tan conocidos como el aceite de oliva para reducir el colesterol de la sangre, especialmente en lo que se refiere al colesterol de baja densidad o LDL (siglas en inglés), para aumentar la elasticidad arterial, para prevenir la formación de coágulos y rebajar la tensión arterial. Esta capacidad para fluidificar la sangre se atribuye sin duda a la transformación del ácido alfa-linoléico en prostaglandinas responsables de evitar la aparición de la aterosclerosis (Botanical 1999). La nuez pecanera se comercializa con cáscara y sin cáscara en mitades, pedacería (pedazos, granillo y gránulos) así como polvo de nuez, se consume en estado fresco o bien se procesan para la elaboración de botanas, dulces, pasteles, nieves y paletas, entre otros. Por otra parte, se elaboran subproductos como aceite de nuez, y carbón activado, este último a partir de su cáscara; la madera del árbol es empleada para la elaboración de muebles finos (Jaramillo 2007). El nogal común también destaca por su madera, ya que es una de las mejores de Europa; es dura, bastante fuerte, ligeramente venosa y susceptible de bellísimo pulimento, se aprovecha en la fabricación de muebles. La madera es más posada, mejor vetada y de una bella coloración, esta tiene un color rojizo y se utiliza frecuentemente en ebanistería, madera muy fácil de trabajar pero resistente a la putrefacción, se considera una madera de calidad para adornar la parte externa de muebles diversos o decorar los paneles de los coches o barcos de alta categoría, y en el siglo XVI sustituye al roble en la realización de muebles de lujo (González *et al.* 2010; Botanical 1999).

## INSECTO BLANCO

El gusano de la bolsa de nogal, *Hyphantria cunea* es una de las pocas especies nativas de América que ha sido introducida accidentalmente a Europa y Asia. En Europa se detectó en 1940 en Yugoslavia, de ahí se dispersó al oeste y este del continente. En Asia se reportó por primera vez en Tokio en 1945, expandiéndose al norte de Japón después Korea y China (Gomi 2005; Takeda 2005).

*H. cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae), probablemente es el insecto que posee el más amplio rango de hospederos reportado, ataca una gran variedad de árboles frutales y forestales, la larva es capaz de alimentarse de 636 especies de plantas en el mundo, sin embargo el cenizo, olmo y nogal parecen ser su dieta preferida en América (Worth 1994). Es un insecto nativo de Norte América, donde su rango de hospederos va desde Canadá (45°N) hasta el Golfo de México (30°N), con un número de generaciones que varía desde una en el norte a más de cuatro en el sur. (Goto *et al.* 2001.) Cada hembra deposita entre 400 y 500 huevecillos sobre el envés de las hojas, las larvas empiezan a alimentarse de las hojas formando una telaraña alrededor de ellas de aspecto desagradable y de color blanco sucio, que encierra el follaje en los extremos de las ramas del árbol. Los huevos eclosionan y las larvas diminutas empiezan a construir una red, adjuntando hojas para alimento. A medida que crecen, amplían la red, cubriendo más follaje y así abarcan más comida. Los huevos tardan una semana en eclosionar, las

larvas se alimentan en colonias expandiéndose conforme la larva se desarrolla. El estado larval dura 6 semanas aproximadamente, al final busca un lugar con condiciones apropiadas y pupa para completar su ciclo. El ciclo total desde huevo a adulto se completa entre 50 a 60 días (Shetlar 1991; Klass 2010).

Dependiendo de la ubicación, puede haber de uno a cuatro generaciones por año. Suele ser de sólo escasa importancia económica como plaga forestal. Sin embargo, los árboles de sombra y ornamentales pueden ser fuertemente defoliadas y la presencia de las grandes redes, antiestéticas pueden hacerlos estéticamente desmerecer. Infestaciones persistentes de árboles individuales pueden causar extremidad y muerte de ramas y pueden reducir la producción de nueces en las pacanas (Keith 1997).

Para el control de esta plaga se utilizan principalmente insecticidas químicos. Entre los pesticidas usados para su control se encuentran el fenitrothin y el isoxathion, sin embargo las larvas han desarrollado tolerancia a estos (Yamanaka *et al.* 2001). El cultivo del nogal pecanero es atacado por diversas plagas, entre ellas *H. cunea*, causa defoliación grave del nogal reduciendo el vigor del árbol, afectando su productividad (Douce *et al.* 1997; Shetlar 2000). Si no se utiliza un control a tiempo puede ocurrir una defoliación severa, debilitando y algunas veces matando a los árboles (Worth 1994).

Dependiendo de la ubicación, puede haber de uno a cuatro generaciones por año. Suele ser de sólo escasa importancia económica como

plaga forestal. Sin embargo, los árboles de sombra y ornamentales pueden ser fuertemente defoliadas y la presencia de las grandes redes, antiestéticas pueden hacerlos estéticamente desmerecer. Infestaciones persistentes de árboles individuales pueden causar extremidad y muerte de ramas y pueden reducir la producción de nueces en los nogales pecaneros (Keith 1997).

### **CRÍA DE NIVEL DE LABORATORIO**

Lo primero que se debe decidir cuándo se desea iniciar un procedimiento de cría en cautiverio es su finalidad (Gasca 2006). La cría de insectos presenta una serie de aplicaciones biológicas que van más allá de ser un sistema de producción de individuos. Si el objetivo es el de obtener una serie de ejemplares para mantener colecciones de referencia de insectos, esta actividad se simplifica a contar con lo necesario para la producción de individuos. Pero si el objetivo es el de estudiar ciclos vitales, patrones de comportamiento e inclusive la obtención de varias generaciones consecutivas, se requiere de una metodología específica que permita mantener las especies de manera que puedan ser estudiadas en cualquier momento sin alterar las condiciones de vida, ni el medio físico en que se desarrollan. La dieta artificial Shorey, es utilizada para la cría de insectos del orden Lepidoptera con ella se han conseguido la producción masiva de algunos insectos lepidópteros, criados en laboratorio como: *Trichoplusia ni*, *Heliothis virescens*, *Spodoptera littoralis*, *Diatraea saccharalis* (Ruiz 1998; De Luna 2002; Saucedo 2003). Takeda (2005), trabajó con *H. cunea*, cabeza

negra y cabeza roja, utilizando una dieta artificial para *Diatraea grandiosella* Dyar, a base de frijol de habas, mediante alojar varias parejas de adultos en una jaula de ovoposición, hasta obtener masas de huevos, una vez que eclosionaron las larvas se sometieron a fotoperiodo luz: oscuridad 16:8 y 12:12 para determinar la etapa sensible y las pupas permanecen por más de 10 días después de la última eclosión de pupas bajo fotoperiodos de 16:8 durante la diapausa. Los periodos fueron más cortos en las cabeza negra ( $35.7 \pm 3.7$  días) que en las cabeza roja ( $48.1 \pm 9.9$  días).

## IMPORTANCIA

*B. thuringiensis* ha sido estudiada desde hace más de un siglo, sin embargo nos sorprende saber que los científicos siempre encuentran algo nuevo en él. Su fascinante contenido genético, junto con la alta diversidad de toxinas derivadas de este microorganismo, lo hace un organismo único. Nuevas actividades se descubren cada día, y como resultado, más plagas pueden controlarse con tecnologías ambientalmente limpias. La actividad tóxica de *B. thuringiensis* es altamente específica y es prácticamente inocuo para los humanos, vertebrados, insectos beneficiosos y otros organismos. Si bien existe una enorme posibilidad para el control de muchas plagas, principalmente en agricultura, silvicultura y la obtención de productos más ecológicos en control de plagas, la ignorancia acerca de las ventajas del uso de productos de BT limita su aplicación. El desarrollo de formulaciones con ingredientes biodegradables es un enfoque favorecido por la reducción del uso de insecticidas químicos, que puede poner en peligro el medio ambiente (Rosas 2009). México ocupa el segundo lugar en producción de nuez a nivel mundial, sin embargo los rendimientos en nuestro país están por debajo de los obtenidos por Estados Unidos, por lo que se requieren estrategias para incrementar la productividad de los nogales mexicanos (Camarena y Sanjuán 2005). Para lograr esto, además de realizar mejoras en los sistemas de producción de nuez es importante disminuir las pérdidas por enfermedades y plagas. Actualmente *H. cunea* se considera una plaga

secundaria del nogal puesto que no ataca directamente el fruto (nuez) sin embargo se sabe que es una plaga muy voraz y es un importante defoliador por lo que afecta de manera indirecta en los rendimientos de producción. El control que se realiza en México para esta plaga se basa principalmente en el uso de insecticidas químicos o un control manual que consiste en quemar los nidos de larvas, por lo que se propone una alternativa de control mediante el uso de formulaciones asperjables de *B. thuringiensis*. Sin embargo existen dos aspectos que reducen su valor comercial, la baja persistencia de las toxinas en el ambiente y la alta diseminación de esporas (cerca de  $10^{15}$  por hectárea). Entre las estrategias actualmente utilizadas para alcanzar el mayor potencial de estos productos, se involucran el desarrollo de formulaciones ambientales más estables con tecnología de liberación lenta o microencapsulación la cual es un sistema versátil que permite la elaboración de encapsulados sólidos o asperjables, además se les pueden incorporar fagoestimulantes para hacer más atractivo el bioinsecticida para el insecto blanco, agentes de adherencia que evitan la pérdida del insecticida por lavado del follaje, etc. (Morales-Ramos 1996). El desarrollo de formulaciones de bioinsecticidas para su uso agrícola, se basa principalmente en la baja residualidad que presentan estos productos en el campo, su baja toxicidad y el empleo de una tecnología limpia para su síntesis (Siegel 2001). La importancia de este trabajo radica principalmente en la formulación y selección de cepas de *B. thuringiensis* con actividad toxica contra este insecto

proporcionando una alternativa para su control, incorporando las características ya mencionadas.

## ORIGINALIDAD Y JUSTIFICACION

La necesidad de mantener un Mercado global competitivo en la producción agrícola mundial ha provocado el incremento en el uso de insecticidas químicos, sin embargo la legislación y las demandas públicas en la actualidad están dirigidas a la reducción en el uso de estos compuestos en áreas forestales y agrícolas. En respuesta a estas demandas la industria de plaguicidas ha dirigido sus esfuerzos hacia el desarrollo de productos biológicos para el control de plagas, como plantas modificadas genéticamente, pesticidas botánicos y entomopatógenos.

Se tienen reportes de la susceptibilidad de *H. cunea* a *B. thuringiensis* var. *kurstaki*, (Yaman *et al.* 2002), por lo que se realizó una búsqueda entre las cepas nativas de la colección del Instituto de Biotecnología FCB-UANL, para obtener una cepa efectiva para el control Biológico de esta plaga. La originalidad del presente proyecto radica en el uso de un soporte de formulación a base de polímeros naturales resultado de un proyecto anterior al cual se le adicionarán fagoestimulantes específicos para *H. cunea* así como una cepa de BT nativa con actividad tóxica para esta plaga, para finalmente contar con un formulado asperjable factible de utilizarse en árboles de nogal y otros para el control de *H. cunea*.

## HIPÓTESIS

Utilizando una formulación asperjable a base de *Bacillus thuringiensis*, polímeros naturales y fagoestimulantes específicos se podrá efectuar el control efectivo de *Hyphantria cunea* (Drury).

En la colección de cepas del IB es posible encontrar una cepa de *Bacillus thuringiensis* diferente a la var. *kurstaki* con actividad tóxica contra el gusano de bolsa del nogal, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidóptera: Arctiidae).

## OBJETIVO GENERAL

Encontrar una cepa de *Bacillus thuringiensis* con actividad tóxica contra el gusano de bolsa del nogal, *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidóptera: Arctiidae) y desarrollar un formulado asperjable de *Bacillus thuringiensis* en base a una mezcla de polímeros y fagoestimulantes, para usarse en el control efectivo de esta plaga.

## OBJETIVOS PARTICULARES

1. Implementación de una cría masiva de *Hyphantria cunea* a nivel de laboratorio.

2. Elaboración de bioensayos preliminares con cepas nativas y de colección de *B. thuringiensis*, a dos dosis, 30 y 300 ng de proteína activa de Bt/cm<sup>2</sup> de dieta artificial, para determinar su actividad tóxica contra *Hyphantria cunea* y seleccionar aquellas que presenten arriba del 60% de mortalidad con la dosis más baja.
3. Determinación de la concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de las cepas seleccionadas en el punto anterior contra *Hyphantria cunea*.
4. Determinación del tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) de las cepas seleccionadas de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.
5. Elaboración de bioensayos de preferencia alimenticia para *Hyphantria cunea* con diferentes fagoestimulantes.
6. Propagación de la cepa que presente la mayor toxicidad contra *Hyphantria cunea* en un reactor de 14 litros utilizando un medio de cultivo a base de melaza.
7. Formulación del extracto de *B. thuringiensis* en forma de asperjables con el soporte de formulación a base de polímeros ya diseñado en un trabajo anterior y con incorporación de los o el fagoestimulante específico para *Hyphantria cunea* seleccionado.
8. Elaboración de estudios básicos de suspensibilidad y factibilidad de aspersión a los formulados desarrollados.
9. Evaluación en laboratorio e invernadero de los formulados asperjables desarrollados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Implementación de la cría masiva de *Hyphantria cunea* a nivel de laboratorio.

Se colectaron larvas de gusano telarañero, *H. cunea* de nogales infestados en el estado de Coahuila México, las larvas se trasladaron al laboratorio en botes de plástico de 1 galón, tapado con gasa y se continuó alimentándolas con el follaje del nogal, hasta el llegar al estadio de pupa, posteriormente fueron sexadas, y se colocaron en una proporción de 30 hembras y 20 machos en los mismos botes. A partir de esta población se formó una colonia de adultos. Dentro de las cubetas revestidas con papel encerado en paredes y base, las cuales se usaron como sustrato para la ovoposición, dentro de ellas se colocaron vasitos de 1 oz. con almohadillas de algodón, impregnado de una solución de sacarosa al 15 % para alimentar a los adultos. Posteriormente se realizó la recolección de los huevecillos manualmente, recortando el área donde fueron depositados. Para conservar la viabilidad y evitar deshidratación, las masas de huevecillos se colocaron sobre malla perforada ubicada en la parte superior de vasos de plástico desechables de 12 oz. con dieta artificial Shorey (aproximadamente 1/3 de su capacidad) (Shorey 1965; Ríos-Díez *et al.* 2012). Esta dieta fue utilizada para el crecimiento y

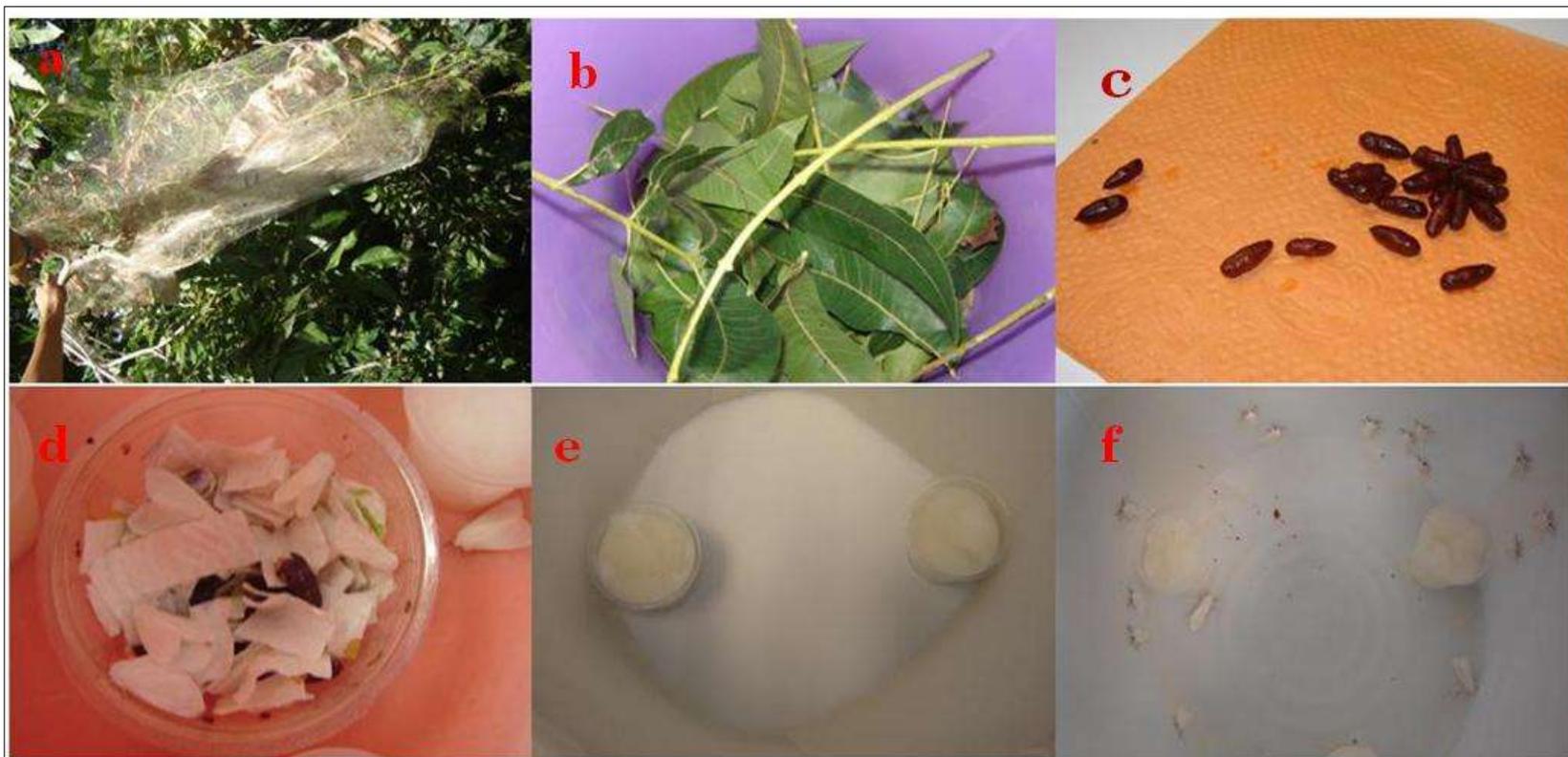


Figura 3.-a).- Nidos de *H. cunea* infectando arboles de Nogal. b).-Larvas de *H. cunea* alimentándose de hojas de Nogal Fresco. c).- Pupas de *H. cunea*. d).- Pupas de *H. cunea* en diapausa. e).- Cubetas, revestidas con papel encerado y vasitos son algodón impregnado de sacarosa 15%. f).- Adultos de *H. cunea*, dentro de las cubetas, hembras y machos.

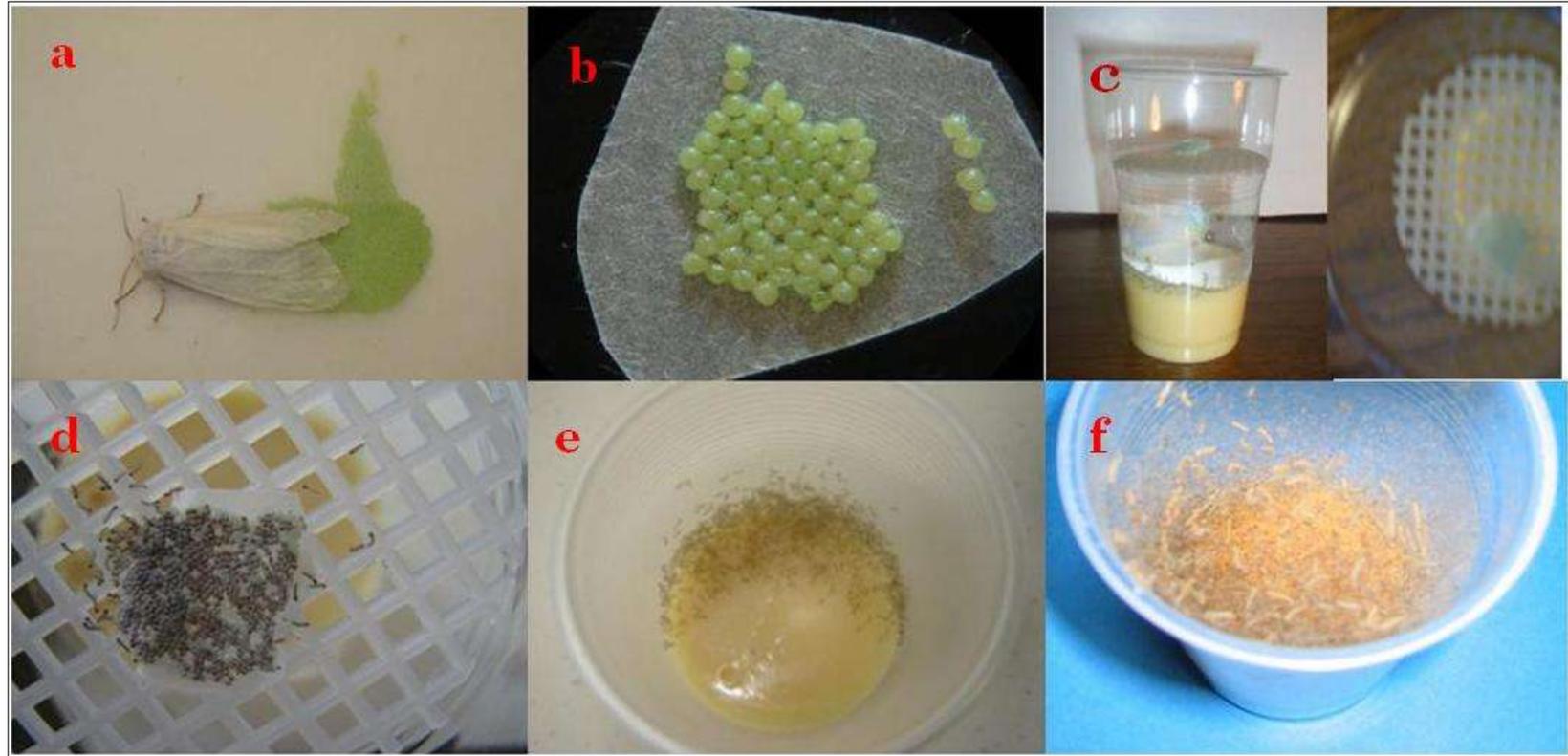


Figura 4. a).-*H. cunea* adulto ovopositando sobre papel encerado b).-Masa de huevecillos sin eclacionar. c).- Masa de huevecillos colocada en la parte superior de vasos desechables de 12 oz. conteniendo dieta nutritiva Shorey. d).- Masa de huevecillos en la superficie de malla eclacionando. e).- Larvas de *H. cunea* al fondo del vaso alimentándose sobre la dieta de desarrollo Shorey. f).- Larvas de *H. cunea* después de 15 días alimentándose.

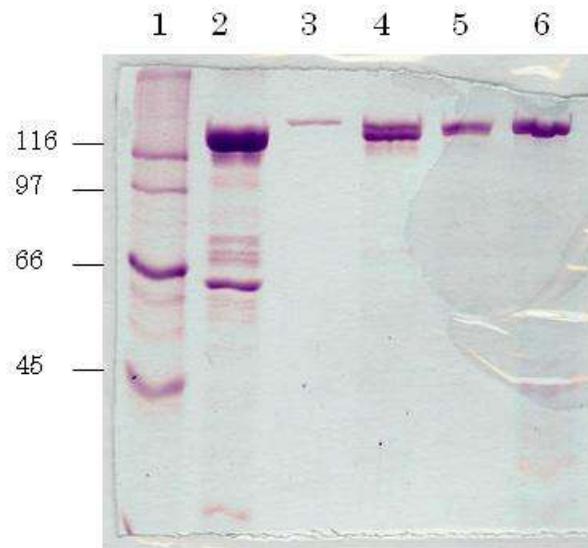
desarrollo de las larvas de *H. cunea*, ya que en la literatura no se encontró una dieta artificial específica para esta plaga. La temperatura se mantuvo entre 26-28° C y la humedad relativa (HR) entre un 70-80 %, con un fotoperiodo de 14h luz y 10h oscuridad.

## **2. Selección de cepas de *B. thuringiensis* con actividad tóxica contra *H. cunea***

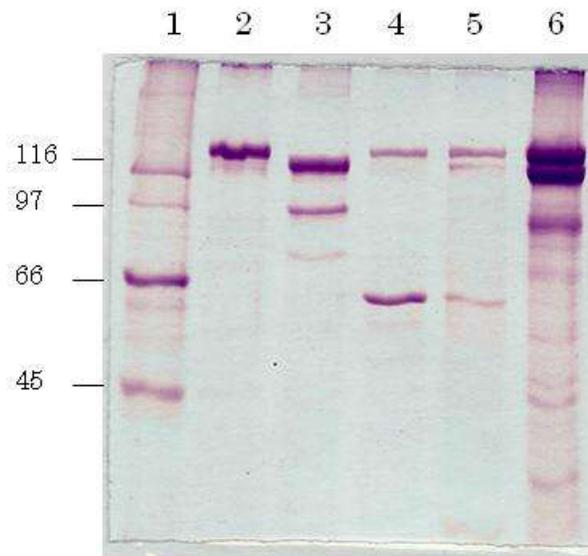
a) **Obtención de Biomasa.** Para seleccionar cepas de *B. thuringiensis*, tóxicas contra el gusano telarañero, se probaron cepas nativas y de colección HD, estas fueron proporcionadas por la Colección Internacional de Cepas de Bt de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL. Las cuales corresponden a diversas serovariedades: HD-1 y GM-34 (*kurstaki*), GM-2 (*morrisoni*), GM-7, GM-10 y GM-58 (*aizawai*), GM-13 (*ostrinae*), GM-18 (*neoleonensis*), GM-33 (*mexicanensis*), GM-43 (*monterreyensis*). Se cultivaron en placas Petri con Agar Nutritivo, a 30°C por 96-120 horas hasta la obtención de suficiente Biomasa de Bt (mezcla de esporas y cristales liberados), cosechando el complejo espора-cristal con 1000 µl de agua bidestilada por placa, la suspensión fue dividida en alícuotas de 100 µl y se almacenó a -20 °C para su utilización posterior. Se les determino esporas/ml así como el perfil de proteínas para llevar a cabo los bioensayos en base a la concentración de proteína activa contra *H. cunea*.

**b) Determinación del perfil de proteínas de las cepas probadas.**

Las proteínas del cristal se analizaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes, para lo cual se transfirieron 20  $\mu$ l de la suspensión espora-cristal a un tubo y se adicionaron 20  $\mu$ l de mezcla de lisis (0.125 M Tris-Cl, 4% SDS, 20% v/v glicerol, 0.02% azul de bromofenol, pH 6.8) con  $\beta$ -mercaptoetanol, este procedimiento se hizo por duplicado. Los tubos fueron colocados en un baño de agua a 100 °C durante 5 min. Se tomó una alícuota de 5  $\mu$ l de esta mezcla de esporas y cristales y se aplicó en geles de poliacrilamida discontinuos al 10%, la electroforesis se llevó a cabo con buffer Tris-glicina (0.025M Tris, 0.192M Glicina, 0.1% SDS pH8.3) a 10 y 20 mA en el gel concentrador y separador, respectivamente. Para estimar la concentración de proteína del cristal en el gel, se utilizó albúmina bovina a una concentración de 2.0  $\mu$ g/ $\mu$ l y para conocer el peso molecular se utilizaron seis proteínas: miosina de peso molecular 205 kDa,  $\beta$ -galactosidasa de 116 kDa, fosforilasa B de 97 kDa, albúmina bovina de 66 kDa, albúmina de huevo de 45 kDa y anhidrasa carbónica que tiene un peso molecular de 29 kDa. Al final, los geles fueron teñidos con el colorante azul de Coomassie al 0.1 %. La concentración de las proteínas fue determinada con el programa Quantity One (versión 4.3.0, Bio-Rad, Hercules (Iracheta *et al.* 2000; Crespo *et al.* 2008).



A



B

Figura 5. Perfil de proteínas de las cepas de *B. thuringiensis* Gel de electroforesis en poliacrilamida. Panel A).- carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2; HD-1, carril 3; GM-2, carril 4; GM-7, carril 5; GM-10, carril 6; GM-13. Panel B).- carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2; GM-18, carril 3; GM-33, carril 4; GM- 34, carril 5; GM-43, carril 6; GM-58.

### **3. Evaluación preliminar del efecto tóxico de la biomasa de *B. thuringiensis* contra *H. cunea*.**

Las 10 cepas se evaluaron mediante bioensayos con la incorporación de la biomasa (complejo espora-cristal) de *B. thuringiensis* en la dieta artificial de desarrollo Shorey, se ajustaron 2 dosis, expresadas en ng de proteína activa de Bt/cm<sup>2</sup> de dieta artificial (30 y 300ng/cm<sup>2</sup>) en placas Costar de 24 hoyos (2 cm<sup>2</sup> de dieta por hoyo) donde se dispersaron 40 µl de la dilución de la muestra en la superficie, posteriormente se transfirió una larva de dos días de *Hyphantria cunea* por hoyo (Iracheta *et al.* 2000). Como control se utilizó dieta sin extracto de *B. thuringiensis*. La mortalidad se registró a los 5 días, y los resultados se expresaron en % de Mortalidad. (Lambert *et al.* 1995) Se seleccionaron las cepas que mostraron una mortalidad mayor al 60% a la dosis más baja de incorporación en la dieta (30ng/cm<sup>2</sup>). El porcentaje de mortalidad fue analizado 5 días después de la exposición de las larvas a la dieta tratada con *B. thuringiensis*. Los resultados fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA), así como una prueba de Tukey (P≤0.05), usando el SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.

#### **4. Determinación de CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub> y TL<sub>50</sub>.**

A las cepas seleccionadas se les determinó la CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> mediante bioensayos, con la incorporación del complejo proteínico de *B. thuringiensis* en la dieta de Shorey. Se utilizaron 7 concentraciones sucesivas, que van desde los 300 a 0.0001 ng/cm<sup>2</sup> hasta encontrar la CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub>. Para el tiempo letal medio (TL<sub>50</sub>) la mortalidad se registró diariamente por espacio de 5 días consecutivos. Los valores de CL<sub>50</sub> y CL<sub>90</sub> así como los de TL<sub>50</sub> fueron evaluados mediante un análisis probit Polo Plus ver. 1.0 (LeOra Software 2003). Todos los experimentos fueron realizados por duplicado (Finney 1962).

#### **5. Propagación de la cepa que presente la mayor toxicidad contra *H. cunea*.**

Para obtener suficiente cantidad de ingrediente activo de la cepa seleccionada de *B. thuringiensis*, tóxica para *Hyphantria cunea* se propagó en un bioreactor de 14 litros de capacidad (New Brunswick Sc. Co., New Jersey, USA), con un volumen operacional de 10 litros de medio de cultivo a base de melaza (Galán Wong 1993). Los parámetros de fermentación que se mantuvieron fueron 30°C, pH 7, 1 vvm de aireación y 500 r.p.m. de agitación, con 1% de inóculo. La recuperación del extracto de *B. thuringiensis* se realizó utilizando el método de secado por Aspersión con un equipo de secado por

aspersión (Browen Engineering, Inc.) bajo las siguientes condiciones: temperatura de entrada de 100-120°C y temperatura de salida de 70-90°C.

## **6. Bioensayos de Preferencia Alimenticia para *H. cunea***

a) **Preparaciones Granulares.** Se elaboraron soportes a partir de una mezcla prediseñada de dos polímeros como matriz encapsulante; Almidón modificado (Capsul®) y Gelatina bovina, (Rosas García *et al.* 2006), en relación 1:1. A la mezcla se le adicionó un aditivo fagoestimulante seleccionado en base a los hospederos del insecto plaga: (polvo de hoja de nogal, polvo de hoja de cenizo, polvo de hoja de mora, polvo de hoja de níspero, polvo de cascara de nuez y un fagoestimulante comercial en polvo Coax®) en una concentración del 4%. Los aditivos fagoestimulantes se prepararon de la siguiente manera: las hojas de nogal, cenizo, mora, níspero y la cascara de nuez se colocaron en charolas de aluminio y después en un horno de tiro forzado a 40 o 45°C de temperatura por 5 días. Enseguida se molieron en un molino de perlas, y se tamizaron por malla No. 30 hasta obtener un polvo fino, posteriormente se almacenaron en recipientes herméticos a temperatura ambiente hasta su uso (Tabla 3.). Los soportes granulares se prepararon mezclando los polímeros y fagoestimulante con una espátula y suficiente cantidad de agua destilada hasta formar gránulos en forma de miga. Se colocaron sobre

charolas de aluminio y se deshidrataron en un horno de tiro forzado a 40 o 45°C de temperatura por 24 h. Con guantes de látex los gránulos de desmoronaron manualmente y se tamizaron por malla No. 6 para obtener uniformidad en el tamaño de partícula, posteriormente se almacenaron en recipientes herméticos a temperatura ambiente hasta su utilización.

b) **Preferencia Alimenticia.** Se utilizó el método de dos alternativas para evaluar la preferencia alimenticia (Bartlet *et al.* 1990). Se prepararon cajas Petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con una capa de pasta de parís y carbón activado (15:1), la cual se dejó secar por 6 h a temperatura ambiente. Posteriormente la capa del fondo de la placa se humedeció ligeramente con agua destilada y se colocaron 25 mg de cada soporte granular a comparar, en lados opuestos de la placa Petri. Se utilizaron trozos de la Hoja de Nogal Fresco como control positivo, y la mezcla de Polímeros sin fagoestimulante como control negativo. Se realizaron 6 repeticiones para cada comparación. Cada placa Petri se humedeció nuevamente con agua destilada y se colocaron 25 mg de cada uno de los gránulos a comparar depositándolos uno frente al otro, se le transfirieron 10 larvas de 2 días de nacidas de *H. cunea* en el centro de cada placa, se sellaron con Parafilm® en los bordes para evitar pérdida de larvas y

se dejaron durante toda la noche en completa oscuridad a 28°C. Después de 16 horas, las cajas fueron congeladas a -30°C por 8 h y el número de larvas sobre cada sitio se registró. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) (F calculada) y la prueba de comparación de medias de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media del número de larvas atraídas sobre cada pila del soporte con su error estándar utilizando el programa SPSS versión 17.0.



Figura 6. Propagación de *Bacillus thuringiensis*, a nivel Fermentador de 14 l., para la Obtención de Biomasa.



Figura 7. Determinación de Preferencia Alimenticia de *H. cunea*, se probaron varios hospederos del insecto plaga como fagoestimulantes. a).- Hoja de Nogal, b).- Hoja de Cenizo, c).- Hoja de Mora, d).- Hoja de Níspero, e).- Cascara de Nuez, f).- Coax<sup>®</sup>.



Figura 8.Elaboración de los Aditivos como Fagoestimulantes. Molienda en molino de perlas, Cribas. Polvo de tamaño de partícula uniforme.

Tabla 3. Composición de los Soportes Granulares para la determinación de la preferencia alimenticia hacia larvas de *Hyphantria cunea*.

Soporte de Formulación	Fagoestimulantes 4% P/P						Hoja de Nogal Fresca <sup>1</sup>	Polímero <sup>2</sup>
	Capsul®-Gelatina <sup>1</sup>	Nogal	Cenizo	Mora	Níspero	Cascara de Nuez		
X	X							
X		X						
X			X					
X				X				
X					X			
X						X		
X							X	
X								X

Todos los fagoestimulantes de prepararon en forma de polvo seco. Coax®= producto comercial. 1= se utilizó como control positivo. 2= se utilizó como control negativo.

## 7. Formulaciones Asperjables de *Bacillus thuringiensis*.

Con el fagoestimulante elegido o de mayor preferencia por *H. cunea*, se desarrollaron 8 formulados asperjables diferentes de acuerdo al Tabla 4.

En los todos los formulados se utilizó el soporte a base de la mezcla de polímeros naturales (Capsul® Gelatina bovina), según el trabajo realizado por Rosas-García *et al.* 2004, incorporando además un aditivo adherente al 2% (Goma de Guar, Goma Core® y Goma Xantana), además de un formulado sin aditivo. El complejo espora-cristal de la cepa de BT seleccionada se agregó a una concentración del 10% y el fagoestimulante a una concentración del 4%. De cada formulación se elaboraron 8 Tratamientos con y sin el extracto de *B. thuringiensis* (Tabla 4.). Se utilizó como control negativo la mezcla sin BT y sin aditivo adherente, todas las preparaciones se resuspendieron en agua suficiente y se secaron por Aspersión (Brown Engineering, Inc.) bajo las condiciones de temperatura de entrada a 100-120°C y temperatura de salida de 70-90°C. Para corroborar la eficacia de las formulaciones se realizó nuevamente un análisis de preferencia alimenticia, se utilizó el método de dos alternativas (Bartlet *et al.* 1990), como se explica en el punto 6b), para evaluar la preferencia de las formulaciones asperjables. El bioensayo de dos alternativas se basó en 360 pares de comparaciones distribuidas en 36 tratamientos. Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) (F calculada) y la prueba de comparación de

Tabla 4. Elaboración de Formulados Asperjables de *B. thuringiensis* GM-10 para el control de *Hyphantria cunea*.

Ingredientes (g)*						
Tratamiento	Formulado	Complejo espora-cristal de <i>B.t</i> GM-10	Fagoestimulante Polvo de hoja de cenizo	Capsul®	Gelatina	Aditivo
1	Bt GG	30	12	237	15	6g GG
2	Bt GX	30	12	237	15	6g GX
3	Bt GC	30	12	237	15	6g GC
4	Bt S/A	30	12	237	15	0
5	sBt GG	0	12	267	15	6g GG
6	sBt GX	0	12	267	15	6g GX
7	sBt GC	0	12	267	15	6g GC
8	sBt S/A	0	12	267	15	0

\* Mezclados con agua destilada en cantidad suficiente. Aditivos: GG Goma de Guar, GX Goma Xantana, GC Goma Core®, S/A sin aditivo, Capsul®: almidón modificado, Bt: con Bt. sBt: sin Bt.

medias de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media del número de larvas atraídas sobre cada pila del soporte con su error estándar utilizando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc. (Rosas García 2002).

## **8. Evaluación de la Actividad Insecticida de los Formulados Asperjables**

Se efectuaron bioensayos de la formulaciones asperjables para lo cual se calculó la cantidad del formulado seco a reconstituir en agua estéril, (ng de proteína activa de Bt/cm<sup>2</sup>) para incorporarse a la dieta artificial para *H. cunea* (Lambert *et al.*, 1995). La mortalidad fue analizada 5 días después de la exposición para obtener los valores de CL<sub>50</sub>. Los formulados se almacenaron a temperatura ambiente y a temperatura de refrigeración (4°C), para evaluar la vida de anaquel, se efectuaron bioensayos de mortalidad cada 3 meses, durante 9 meses consecutivos. Los resultados fueron analizados mediante probit Polo Plus ver. 1.0 (LeOra Software 2003) y por análisis de varianza (ANOVA), así como una prueba de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media de las LC<sub>50</sub>, con su error estándar usando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.

## **9. Determinación de Suspensibilidad de los Formulados**

Los formulados asperjables se reconstituyeron en agua para obtener una concentración de principio activo al 1%, en un volumen de 100 ml, incluyéndose como controles un formulado comercial, Dipel, y el extracto de la cepa GM-10 obtenida por el método tradicional de Dulmage de Lactosa-Acetona (L-A), (Dulmage *et al.* 1970). Estos se colocaron en una probeta de 125 ml, se homogenizó adecuadamente con agitación, dejándose en reposo absoluto durante 0.0, 0.5, 1, 2, 3 y hasta 8 horas, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas de 5ml en viales previamente tarados, estas se mantuvieron en una estufa a 80°C para evaporar el agua, se pesó el residuo depositado, la medición se realizó por duplicado para cada formulado y para cada uno de los tiempos especificados, para obtener una curva de suspensibilidad (Barberá 1976). El peso de las partículas suspendidas en la muestra se evaluaron por un análisis de varianza (ANOVA), así como una prueba de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media de las partículas extraídas en la muestra y con su error estándar usando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.

## **10. Factibilidad de Aspersión a los Formulados**

Los formulados se reconstituyeron en agua para obtener una concentración de principio activo al 10%, y la factibilidad de aspersión se midió utilizando un aspersor SMI® de 50 ml de capacidad, el cual tiene una

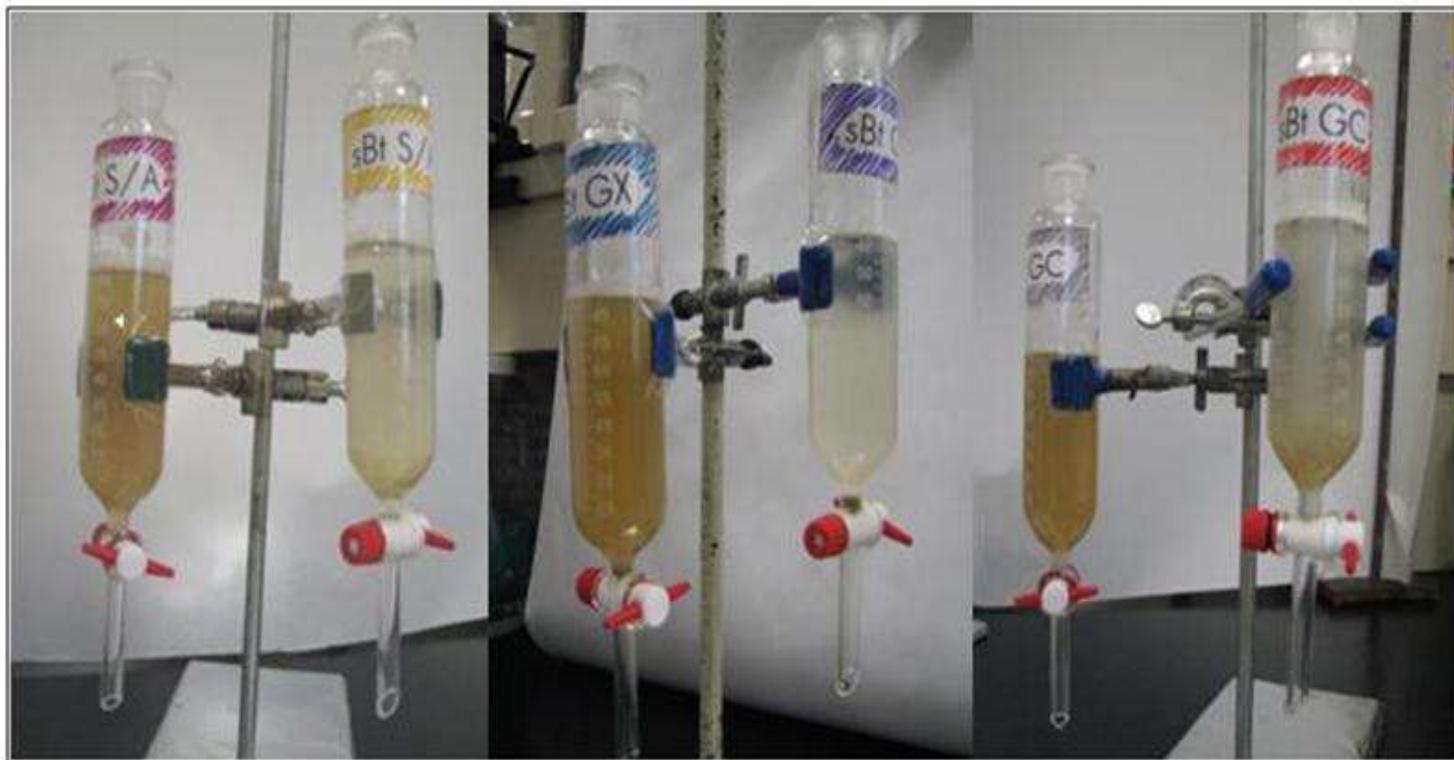


Figura 9. Determinación de la Suspensibilidad de los Tratamientos; se midió en probetas de 125 ml. por un periodo de 8 h.

boquilla de 0.5  $\mu\text{m}$  y trabaja a una presión de 5 lb, los formulados se hicieron pasar bajo estas condiciones y el resultado se expresó como factible o no factible.

## 11. Prueba de Adherencia en Portaobjetos

Para la prueba de adherencia, se utilizaron 10 portaobjetos por formulado, los cuales se llevaron a peso constante para luego humedecerlos y colocar por extensión en superficie, 20 mg del formulado a evaluar en cada portaobjeto. Se evaluaron 12 tratamientos: Los 8 formulados desarrollados y como controles se utilizó: 1) Agua, 2) Mezcla de polímeros más un adherente comercial (Bionex <sup>®</sup>) y *B. thuringiensis*, 3) Mezcla de polímeros con Bionex <sup>®</sup> y sin *B. thuringiensis*, 4) Formulado comercial (Dipel). Los portaobjetos se dejaron secar por 24h y posteriormente se lavaron utilizando 25ml de agua bidestilada por portaobjeto, utilizando para ello una bureta de 100ml a un flujo constante. Se secaron en una estufa a 40°C y posteriormente se pesaron, para obtener el porcentaje de adherencia de cada formulado. Los resultados fueron sometidos mediante análisis de varianza (ANOVA), así como una prueba de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media del peso adherido, con su error estándar usando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.

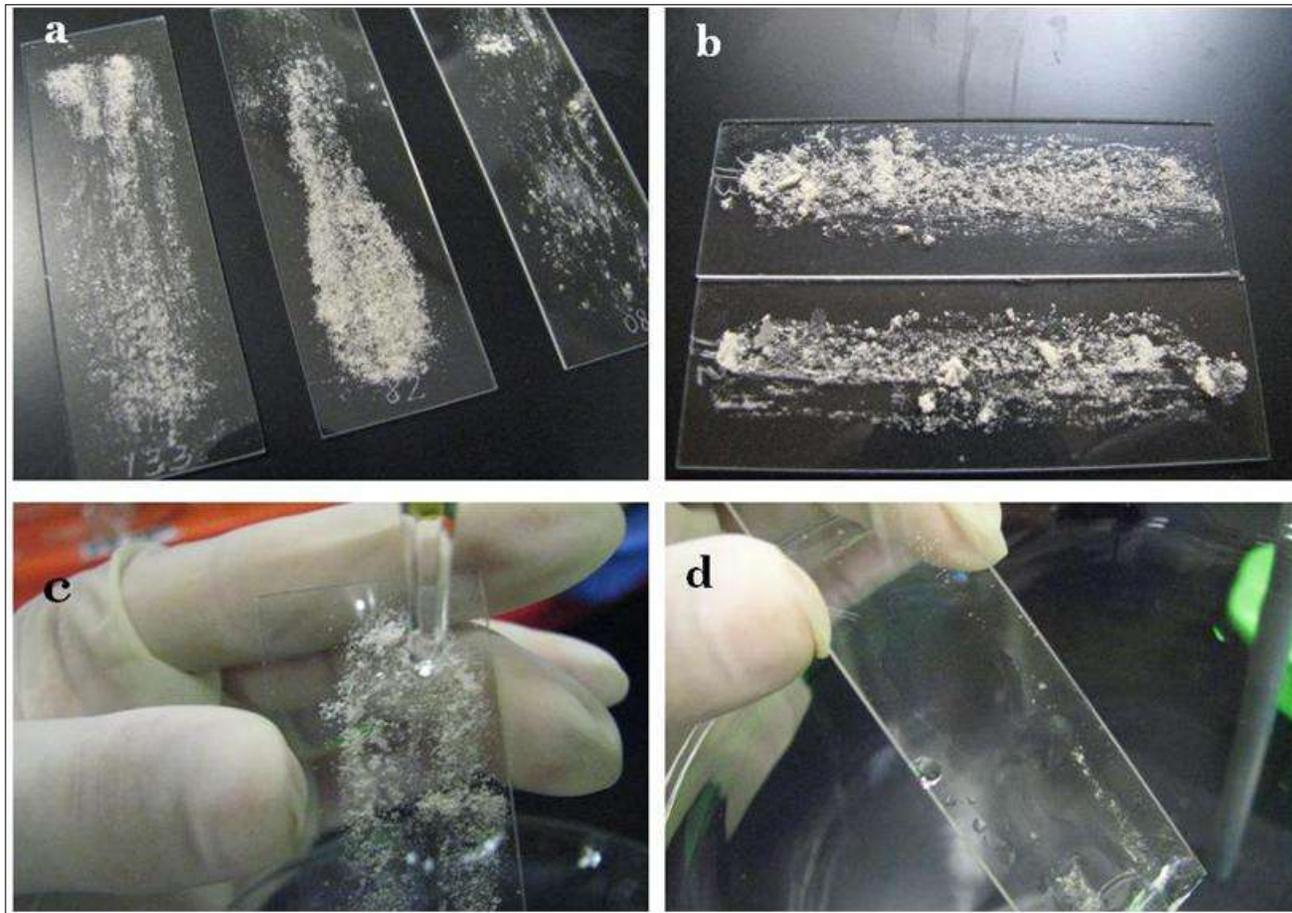


Figura 10. Prueba de adherencia en Portaobjetos, a).- Los tratamientos se extendieron en la superficie del portaobjetos, b).- se dejaron secar por 24 h. c).- Se lavaron con un volumen constante de agua destilada, d).- Se tararon y pesaron.

## 12. Evaluación de los formulados a nivel de invernadero

a) **Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones en Invernadero.** Se emplearon plantas de nogal pequeñas de 1.5 m de altura, de las variedades Western Schley y Wichita, los formulados fueron aplicados por aspersión en el follaje, a una concentración del 10%. En el bioensayo se incluyeron dos controles una formulación comercial (Dipel) y un control negativo (agua). La mitad de las plantas se sometieron a un tratamiento de simulación de lluvia y la otra mitad se regaron sin aplicar agua en las hojas. Se tomaron 5 muestras de hojas de cada planta y se recortaron trozos de 1cm<sup>2</sup> c/u de las hojas (2 trozos/hoja), a los 0, 3, 6 y 9 días después de la aplicación de los formulados se colocaron dentro de placas Petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con papel filtro húmedo y se expusieron a 5 larvas de *H. cunea* de 2 días de edad por trozo. Se dejó que las larvas se alimentaran de los trozos de hoja por 24 horas, posteriormente se contaron las larvas muertas y las sobrevivientes se pasaron a dieta artificial sin *B. thuringiensis*, para medir el % de mortalidad nuevamente a los 5 días. Con los resultados se realizó un análisis de varianza (ANOVA) así como una prueba de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$ , donde se comparó la media de la mortalidad, con su error estándar usando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.

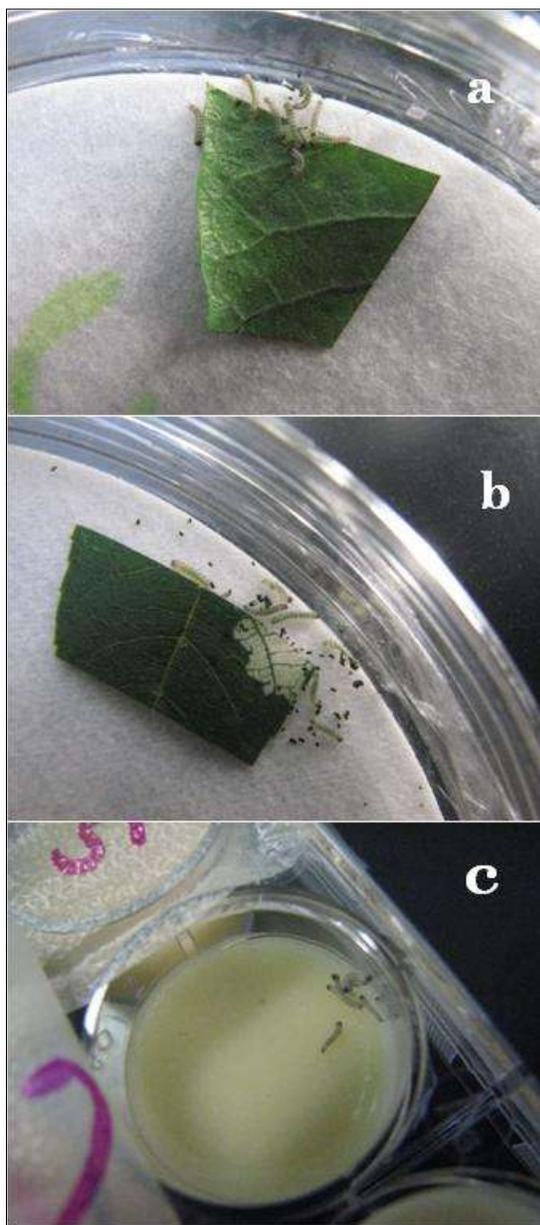


Figura 11. Persistencia de las formulaciones en Invernadero. a y b).-larvas de *H. cunea* alimentándose de los trozos de hojas de Nogal asperjadas con las formulaciones. c).- larvas de *H. cunea* alimentándose después de la dieta Shorey.

b) **Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados.** Se emplearon plantas de nogal pequeñas de 1.5 m de altura, de las variedades Western Schley y Wichita, las cuales se infestaron con 50 larvas neonatas de *H. cunea* por árbol, se dejaron pasar 7 días para la formación de nidos. Posteriormente se evaluaron los 8 formulados, un formulado comercial (Dipel) y como control agua. Las plantas se rociaron con los formulados, mediante un aspersor, con una suspensión al 10 % de ingrediente activo, 25 ml por árbol. Se determinó el número de larvas al tiempo 0, 24 y 48 horas después de la aspersion para determinar el % de sobrevivencia de las larvas sobre las plantas. Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) así como una prueba de Tukey HSD con una  $P \leq 0.05$  con los resultados, donde se comparó la media de la sobrevivencia, con su error estándar usando el programa SPSS Statistics 17.0 by SPSS Inc.



Figura 12. Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

**Implementación de la cría masiva.** La primera generación establecida, se inició del estadio larvario utilizando para ello 200 larvas, a partir de las cuales se continuó para lograr las siguientes generaciones y establecer el ciclo biológico de *H. cunea* criada en el laboratorio bajo las condiciones de 26- 28°C, 70-80 % de HR y un foto-periodo de 14:10, con ciclos generacionales de  $40.0 \pm 5.0$  días que corresponde al tiempo de desarrollo en días requeridos desde el estado de huevecillo hasta le periodo de preovposición (Gomi *et al.* 2005). Takeda (2005), en estudios relacionados con los ciclos de vida de *H. cunea*, reporta resultados similares; un periodo larval corto de  $(35,7 \pm 3,7)$  días) y una temperatura baja de 25°C. Los huevecillos son pequeños de color verde brillante y se tornan grises antes de eclosionar, duran  $9.0 \pm 1.0$  días en este estadio. Las larvas, conforme se desarrollan su coloración varia de amarillo pálido a verde, y a lo largo de su cuerpo presenta de 10 a 12 pequeñas verrugas coronadas por mechones de pelos largos. La cabeza se va tornando de café a negra. La duración media de las larvas es de  $22.5 \pm 2.5$  días, llegando a presentar hasta siete instar. Las pupas vivas son de color café oscuro y presenta 12 apéndices, con un peso promedio de  $111.0 \pm 2.3$  miligramos, el paso de pupa a adulto es de  $8.0 \pm 1.0$  días. Los adultos o polillas son de color blanco tanto en las alas posteriores como en las anteriores y permanecen  $4.0 \pm 2.0$  días como adulto. Durante el

2do. día de ovoposición las hembras producen en promedio la mayor cantidad de huevecillos  $1268 \pm 402.02$  que va disminuyendo con los días, observándose en total un promedio de  $1812.8 \pm 503.15$  huevecillos por hembra. Temperaturas de 26-28°C en el presente trabajo, mostraron buenos resultados en el establecimiento de la cría, concordando con lo reportado por Gomi *et al.* 2005, que observa que el tiempo de desarrollo de las larvas disminuye cuando la temperatura se incrementa. La dieta artificial de Shorey, fue aceptada como alimento por las larvas de *H. cunea*, y se logró obtener una población en cautiverio del insecto blanco con larvas sanas y robustas, esto también sugiere que la dieta artificial puede ser mejor que alimentarse de la planta hospedero, logrando hasta un séptimo instar (Gomy *et al.* 2005; Takeda 2005).

Para obtener una mayor viabilidad de las masas de huevecillos al recortarlos del papel encerado, los primeros días se colocaron sobre cajas Petri con papel filtro húmedo, para posteriormente trasladarlos a una malla perforada la cual se colocó en la parte superior de vasos de plástico desechables de 7.5 cm de diámetro y 4 cm de profundidad (12 oz.) conteniendo 1/3 partes de dieta artificial Shorey, una vez que estos eclosionan, las larvas migran hacia la dieta para alimentarse (Figura 4.).

La dieta artificial fue reemplazada cada 15 días, dependiendo del estadio larvario, depositándose 5 larvas por vaso (12 oz.) hasta que las larvas

puparon, estas se recolectaron y colocaron en copas con vermiculita para conservar la humedad y de nuevo en cubetas de 4 litros de capacidad, hasta obtener los adultos, y continuar con la siguiente generación. Takeda (2005), informa sobre larvas de *H. cunea*, cabeza negra que se alimentan independientemente del fotoperiodo en el que se encuentren, a diferencia de las larvas cabeza roja, que durante la obscuridad cesan de alimentarse. Las estudiadas en el presente trabajo son cabeza negra, se alimentan durante toda la noche, se desarrollaron bien logrando obtener el establecimiento de la cría. Gomy *et al.* 2005, encuentra diferencias cuando las larvas se alimentan con hojas del hospedero que cuando se alimentan con una dieta, estas últimas de desarrollan mejor, en peso y tamaño (Takeda 2005; Gomy *et al.* 2005). La cría de insectos, junto con el seguimiento de los ciclos de vida de las especies, no solamente permite estudiar los aspectos más relevantes sobre su biología, sino que además facilitan los programas de manejo para el control de plagas en aquellas especies que son de importancia tanto agrícola como forestal.

**Estimación de la toxicidad.** Una vez establecida la cría de *H. cunea* y contando con 6 generaciones de larvas activas, se determinó la actividad tóxica de las cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas. A cada una de las cepas se le realizó el recuento de esporas en donde se obtuvieron valores que van desde  $10^6$  hasta  $10^9$ . En el análisis de proteínas de las cepas de *B. thuringiensis* presentan  $\delta$ -endotoxinas en concentraciones que van desde

0.010 hasta 0.150 ng de proteína por  $\mu\text{l}$  de Biomasa, (Tabla 5.) siendo las cepas GM-2 y GM-43 (0.010 ng/ $\mu\text{l}$ ) las de menor valor y la HD-1 la de mayor contenido de proteína (150 ng/ $\mu\text{l}$ ).

Tabla 5. Cuantificación de Proteína Activa y Determinación de la cuenta de esporas de la Biomasa de las cepas de *Bacillus thuringiensis*

CEPA	kDa	Mol wt	ng proteína / $\mu\text{l}$	Medias de UFC/ml $\pm$ DE <sup>b</sup>
HD-1	131,21		0.150	75.5 $\pm$ 21
GM-2	nd <sup>a</sup>		0.010	102.5 $\pm$ 7.8
GM-7	158,08		0.064	46.0 $\pm$ 5.7
GM-10	159,96		0.025	5.3 $\pm$ 1.6
GM-13	165,47		0.055	9.9 $\pm$ 2.9
GM-18	132,63		0.066	25.8 $\pm$ 3.1
GM-33	111,37		0.064	21.1 $\pm$ 7
GM-34	52,85		0.025	14.2 $\pm$ 5.3
GM-43	nd <sup>a</sup>		0.010	44.7 $\pm$ 17
GM-58	110,65		0.067	8.9 $\pm$ 5.9

<sup>a</sup>baja concentración <sup>b</sup>UFC expresados  $10^8$  esporas/ml de Biomasa. n=3

El bioensayo preliminar para la evaluación de cepas de *B. thuringiensis*, nos muestra que a una dosis baja, (30 ng / $\text{cm}^2$ ) siete de las cepas presentaron mortalidades mayores del 60 %, para *H. cunea*, así como mortalidades de hasta 100% para la HD-1 y GM-10. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en varias de las cepas probadas. Las cepas

GM-13, GM-33 y GM-2 observaron valores más bajos de 6, 8 y 19 % de mortalidad respectivamente. Sin embargo el resto de las cepas demostraron buena actividad contra el gusano telarañero, ( $F = 26.697$ ,  $gl = 9$ ,  $P < 0.01$ ) por lo que estas fueron seleccionadas para determinarles  $CL_{50}$ ,  $CL_{90}$  y  $TL_{50}$  (Tabla 6.).

Tabla 6. Prueba preliminar de la mortalidad ( $\pm$  DE) de las cepas probadas de *Bacillus thuringiensis* contra larvas neonatas de *Hyphantria cunea* Drury.

CEPAN	No. de Larvas muertas $\pm$ DE 300 ng <sup>a</sup> /cm <sup>2</sup>	No. de Larvas muertas $\pm$ DE 30 ng <sup>a</sup> /cm <sup>2</sup>	% de M*
HD-1	24.00 $\pm$ 0.00 a	24.00 $\pm$ 0.00 a	100
GM-2	6.67 $\pm$ 4.62 b	4.67 $\pm$ 2.3 b	19
GM-7	24.00 $\pm$ 0.00 a	20.67 $\pm$ 4.16 a	86
GM-10	24.00 $\pm$ 0.00 a	24.00 $\pm$ 0.00 a	100
GM-13	2.00 $\pm$ 0.00 b	1.33 $\pm$ 1.15 b	6
GM-18	24.00 $\pm$ 0.00 a	19.33 $\pm$ 8.08 a	81
GM-33	3.33 $\pm$ 2.3 b	2.00 $\pm$ 1.00 b	8
GM-34	24.00 $\pm$ 0.00 a	21.33 $\pm$ 2.31 a	89
GM-43	24.00 $\pm$ 0.00 a	22.67 $\pm$ 2.31 a	94
GM-58	24.00 $\pm$ 0.00 a	22.00 $\pm$ 0.00 a	92
control	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0

N= 1440 larvas, n=72, <sup>a</sup> = nanogramos de proteína de Bt/cm<sup>2</sup> de dieta, \* = mortalidad expresada en la dosis de 30 ng de proteína de Bt/ cm<sup>2</sup>. Valores seguidos por la misma letra no son diferentes significativamente, P=0,05

En la cuantificación de Biomasa no existe relación de la toxicidad con el contenido de esporas ya que la cepa GM-2 presentó un alto contenido de esporas ( $102.5 \text{ UFC} \times 10^7 / \text{ml}$ ), mientras que la mortalidad solo llegó al 19%, sin embargo la cepa GM-10 tiene uno de los valores más bajos en el contenido de esporas ( $5.3 \text{ UFC} \times 10^7 / \text{ml}$ ), y es la que requiere menor concentración para matar el 50% de la población del insecto de prueba.

Yaman *et al.* (2002) reportaron actividad de *B. thuringiensis* contra *H. cunea*, así como tres bacterias más, y le atribuye la actividad insecticida a *B. thuringiensis*, mediante bioensayo. Se probaron serovariedades de BT, de la Colección Internacional de Cepas de BT de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL, y la mayoría presentó actividad contra este insecto. Estudios relacionados con la afinidad de las toxinas a los insectos sugieren que los receptores en las microvellosidades apicales del epitelio del intestino medio son un factor clave en la determinación de la especificidad (Van Rie *et al.* 1990). Por lo, anterior *H. cunea* presenta esa afinidad, o bien la susceptibilidad para los cristales de *B. thuringiensis*, por la eficiente solubilización de los mismos en el intestino de las larvas (Höfte y Whiteley 1998).

En el bioensayo para determinar la Concentración letal media sobresalen tres cepas la GM-10, GM-18 y la HD-1 con  $CL_{50}$  de  $0.007 \text{ ng/cm}^2$  (Pendiente = 1.39,  $X^2 = 1.073$  y  $gl = 4$ ),  $0.030 \text{ ng/cm}^2$  (Pendiente = 0.85,  $X^2 =$

0.709 y  $gl = 4$ ) y  $0.010 \text{ ng/cm}^2$  (Pendiente = 1.62,  $X^2 = 1.20$  y  $gl = 4$ ) respectivamente. La relación de efectividad se mantuvo para la  $CL_{90}$ , la cepa GM10 con  $0.058 \text{ ng/cm}^2$ , HD-1 con  $0.60 \text{ ng/cm}^2$ , en el caso particular de la GM 18 se observó un incremento mayor de la dosis necesaria a  $0.937 \text{ ng/cm}^2$  (Tabla 7.).

El resto de las cepas presentaron  $CL_{50}$  y  $CL_{90}$  relativamente altos por lo que no se consideran adecuadas para el control biológico de *H. cunea*. Sin embargo al observar los datos de  $TL_{50}$  destaca la GM-10 con 80.83 horas (Pendiente = 1.97,  $X^2 = 0.39$  y  $gl = 2$ ), (3.3 días) mientras que la cepa HD-1 mostró una  $TL_{50}$  de 125 horas (Pendiente = 2.57,  $X^2 = 1.1$  y  $gl = 3$ ), (5.2 días). Por otro lado los resultados de  $TL_{50}$  no fueron buenos para la GM-18 ya que presenta una  $TL_{50}$  de hasta casi 5 días (Tabla 8.).

La susceptibilidad de BT contra *H. cunea* mostró resultados prometedores para usarse en el control de esta plaga (Tabla 6.), siete de las cepas probadas presentaron mortalidades arriba del 60%, sin embargo la GM-58 fue significativamente menos tóxica ( $CL_{50}$  de  $2.407 \text{ ng/cm}^2$ ), y la mitad del resto mostraron  $CL_{50}$  desde 0.007 a  $0.030 \text{ ng/cm}^2$  (Tabla 7.). Al comparar las  $CL_{90}$  se descartan algunas, pues se requiere de dosis mayores para eliminar el 90% de la población, destacando tanto en la  $CL_{50}$  como en el  $TL_{50}$  la cepa de *B. thuringiensis* GM-10 con una  $CL_{50}$  de  $0.007 \text{ ng/cm}^2$  y un  $TL_{50}$  de 80.82 h.

Tabla 7. Susceptibilidad de *Hyphantria cunea* a la toxina activa de cepas de *B. thuringiensis*.

CEPA	Pendiente ± DE	Susceptibilidad (95% LC)*		X <sup>2</sup> (gl)	(X <sup>2</sup> /gl)
		CL <sub>50</sub>	CL <sub>90</sub>		
HD-1	1.62±0.48	0.010 (0.004-0.016)	0.060 (0.032-0.435)	1.20 (4)	0.300
GM-7	0.42±0.15	0.113 (0.001-0.604)	118.67 (9.83-216x10 <sup>5</sup> )	0.832 (4)	0.208
GM-10	1.39±0.46	0.007 (0.001-0.013)	0.058 (0.029-0.739)	1.073 (4)	0.268
GM-18	0.85±0.28	0.030 (0.011-0.090)	0.937 (0.206-633.7)	0.709 (4)	0.177
GM-34	0.98±0.24	0.099 (0.038-0.261)	2.006 (0.592-47.25)	0.526 (3)	0.175
GM-43	1.41±0.34	0.086 (0.047-0,215)	0.686 (0.256-8.24)	1.588 (3)	0.529
GM-58	1.08±0.24	2.407 (0.482-7.905)	36.67 (10.23-3776)	4.04 (4)	1.010

\* Expresadas en nanogramos de proteína activa de Bt/cm<sup>2</sup> de dieta artificial, LC= límites de confianza. (gl), grados de libertad. (X<sup>2</sup> /gl), heterogeneidad.

Tabla 8. Tiempo Letal medio de *Hyphantria cunea* a la toxina activa de cepas de *B. thuringiensis*.

CEPA	Pendiente $\pm$ DE	Tiempo Letal Medio (95% LC)*	X <sup>2</sup> (gl)	(X <sup>2</sup> /gl)
		TL <sub>50</sub>		
HD-1	2.57 $\pm$ 0.36	125.04 (107.15-158.40)	1.10 (3)	0.366
GM-7	3.72 $\pm$ 0.41	92.31 (83.48-103.39)	1.63 (2)	0.814
GM-10	1.97 $\pm$ 0.28	80.83 (68.43-98.92)	0.39 (2)	0.196
GM-18	2.22 $\pm$ 0.31	118.20 (82.17-330.31)	2.13 (2)	1.065
GM-34	2.69 $\pm$ 0.31	83.83 (67.90-111.61)	4.03 (3)	1.345
GM-43	1.94 $\pm$ 0.31	105.64 (86.54-144.58)	0.31 (2)	0.157
GM-58	2.42 $\pm$ 0.30	91.89 (79.56-109.97)	0.96 (2)	0.480

\* Expresadas en Horas, LC, límites de confianza. (gl), grados de libertad. (X<sup>2</sup> /gl), heterogeneidad.

La cepa HD-1, *B. thuringiensis* var. *kurstaki* que es utilizada comercialmente, no rebasa las expectativas ya que necesita un TL<sub>50</sub> de 125.04 h para matar el 50% de la población. Por lo anterior la cepa GM-10 de *B. thuringiensis* cumple con las expectativas para el control de esta plaga.

Por otro lado las cepas GM-34 y GM-43 también presentan CL<sub>50</sub> similares ente ellas, pero al observar la CL<sub>90</sub> ésta se dispara en la cepa GM-34 hasta 2.006 ng/cm<sup>2</sup> (Pendiente = 0.98, X<sup>2</sup> = 0.526 y gl = 3) (Tablas 7. y 8.).

**Bioensayos de Preferencia Alimenticia.** Se encuentra bien establecido que la eficiencia de los entomopatógenos que actúan por ingestión puede mejorarse mediante el uso de matrices que incluyan estimulantes de la alimentación que aumentan el consumo del patógeno, resultando en mayor prevalencia de la enfermedad y mejoraron el control de plagas (Fanar y Ridgway 1994). Por lo anterior se utilizó el método de dos alternativas de Bartlett *et al.* (1990) para evaluar la preferencia alimentación de *H. cunea*, y posteriormente seleccionar un fagoestimulante óptimo para formular con *B. thuringiensis*. A las larvas se les permitió elegir alimentarse de cinco preparados con carácter fagoestimulante y uno de tipo comercial (Coax®), además la Hoja de Nogal Fresca como estimulante positivo y la mezcla de polímeros Capsul®-Gelatina, como control negativo. El bioensayo de dos alternativas se basó en 336 pares de comparaciones distribuidas en 28 Tratamientos, y así realizar el análisis ANOVA para observar características de fagoestimulante contra el número de larvas atraídas. Se observó una alta diferencia significativa entre los Tratamientos utilizados ( $F= 19.396$ ,  $gl= 7$ ,  $P < 0.001$ ). Posteriormente mediante la prueba de comparación múltiple de Tuckey verifica esta diferencia al agrupar varios niveles de significancia, donde el polvo de hoja de Cenizo fue el fagoestimulante con mayor aceptación por las larvas de *H. cunea*, después de la hoja de Nogal Fresca, observándose medias de  $6.14 \pm 0.403$  y  $8.62 \pm 0.241$  respectivamente (Tabla 9.).

Por otra parte se realizó un segundo análisis para comprobar el efecto de la presencia o ausencia de fagoestimulantes en los soportes contra el número de larvas atraídas, corroborándose nuevamente una alta diferencia significativa entre ellos ( $F= 52.347$ ,  $gl= 2$ ,  $P< 0.001$ ); y mediante la prueba de

Tabla 9.- Selección de los soportes Granulares con carácter de fagoestimulante para *Hyphantria cunea*.

FAGOESTIMULANTE <sup>a</sup>	Media del número de larvas $\pm$ EE	RP
HN	8.62 $\pm$ 0.241 <sup>a</sup>	1°
CENIZO	6.14 $\pm$ 0.403 <sup>b</sup>	2°
MORA	5.17 $\pm$ 0.460 <sup>bc</sup>	2° - 3°
COAX®	4.64 $\pm$ 0.425 <sup>bcd</sup>	2° - 3° - 4°
CASCARA DE NUEZ	4.48 $\pm$ 0.396 <sup>bcd</sup>	2° - 3° - 4°
NISPERO	4.17 $\pm$ 0.420 <sup>cd</sup>	3° - 4°
NOGAL	3.57 $\pm$ 0.358 <sup>cd</sup>	3° - 4°
POLIMERO	3.05 $\pm$ 0.432 <sup>d</sup>	4°

n= 336, (número total de larvas utilizadas en el experimento); los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ . HN= Hoja de Nogal Fresca. RP= Rango de Preferencia.

Tukey se obtuvieron tres niveles de significancia (Tabla 10.). Estos niveles corresponden a las diferencias entre agregar un aditivo estimulante de la alimentación a los formulados ( $4.69 \pm 0.174$ ) y sin este ( $3.05 \pm 0.432$ ), diferencia estimada en 1.64 larvas, comparada con el huésped Nogal fresco ( $8.62 \pm 0.241$ ) de 5.57 larvas. Esto comprueba el efecto que tienen los

fagoestimulantes sobre los que carecen de ellos, justificando el uso de estos, los cuales garantizan la ingestión del insecticida, y la efectividad de los formulados.

Tabla 10.- Efecto de la presencia o ausencia de fagoestimulantes en los soportes de formulación granulares para *Hyphantria cunea*.

	Media del número de larvas $\pm$ EE
HOJA DE NOGAL <sup>n1</sup>	8.62 $\pm$ 0.241 <sup>a</sup>
FAGOESTIMULANTES <sup>n2</sup>	4.69 $\pm$ 0.174 <sup>b</sup>
POLIMERO <sup>n1</sup>	3.05 $\pm$ 0.432 <sup>c</sup>

n1= 42, n2= 252 (número total de larvas usado en el experimento); los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $p \leq 0,05$ .

Para comprobar que los controles positivo y negativo funcionan como tales se realizó la prueba de ANOVA con los controles evaluados aquí, y efectivamente la diferencia significativa entre estos es alta, ( $F= 126.721$ ,  $gl= 1$ ,  $P < 0.001$ ); y la prueba de Tuckey nos da dos niveles de significancia (Tabla 11.), una diferencia de 5.57 larvas.

Los insecticidas podrían afectar el comportamiento de alimentación de los insectos, evitando la ingestión de dosis letales, sin embargo, el uso de

agentes entomopatógenos, combinados en una matriz de alimentación adecuada basada en polímeros biodegradables mejora esta condición, (Morales-Ramos *et al.* 1998, 2000), además el uso acertado de cebos depende de un conocimiento profundo de fagoestimulantes acertados para un determinado insecto blanco. Los estimulantes de alimentación inducen a las larvas a ingerir el follaje contaminado con los bioinsecticidas, esto resulta en mayor prevalencia de infección y control de plagas (Luna-Santillana *et al.* 2011).

Tabla 11.- Efecto de los controles en los soportes de formulación granulares para *Hyphantria cunea*.

	Media del número de larvas $\pm$ EE <sup>n</sup>
CONTROL POSITIVO	8.62 $\pm$ 0.241 <sup>a</sup>
CONTROL NEGATIVO	3.05 $\pm$ 0.432 <sup>b</sup>

n= 84, (número total de larvas utilizadas en el experimento; los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $p \leq 0,05$ .

El Capsul® que es almidón de maíz modificado, es especial para la encapsulación de sabores o para procesos de aspersion en la industria alimenticia, como saborizantes de especias, aceites, sazónadores y edulcorantes, acidulantes, lípidos, enzimas, microorganismos, antioxidantes,

aceites esenciales, aminoácidos, vitaminas y minerales, etc. (Yáñez-Fernández *et al.* 2005), características que favorecen la encapsulación del complejo espora-cristal, resultando en un polvo de fácil dispersión en agua. (Rosas-García 2006) La gelatina bovina, es un aditivo con excelentes propiedades adherentes y bajo costo (Morales-Ramos 2000), de tal manera que el proceso de formulación es efectivo y fácil de producir. Estos compuestos junto con el Coax® han sido comparados con el comportamiento alimenticio que causan a varias especies de lepidópteros, provocando una alta respuesta, y favorable para el desarrollo de formulaciones (Fonar y Ridgway 1994).

El Almidón de maíz modificado, la pectina, quitina, alginato, lignina y harina de maíz se han promocionado como buenos portadores del ingrediente activo, ofreciendo protección, adherencia y palatabilidad (Dunkle y Shasha 1988; Bartelt *et al.* 1990; McGuire *et al.* 1996; Morales-Ramos *et al.* 1998, 2000; Behle *et al.* 2003). Otros estudios informaron el uso de estimulantes de la alimentación en formulas diseñadas para controlar plagas de lepidópteros. Estas investigaciones demostraron que la adición de estimulantes de alimentación aumentó la ingestión de una dosis tóxica de un ingrediente bioactivo, que conduce a la mayor eficacia de tales productos.

**Formulaciones Asperjables de *Bacillus thuringiensis*.** La efectividad que presenta la formulación insecticida de BT depende en gran medida de la cepa seleccionada y de los materiales inertes y aditivos con los que fue formulado, estos pueden incrementar la alimentación por parte del insecto blanco (Rosas-García 2006). Una vez seleccionado el fagoestimulante apropiado se elaboraron formulaciones al 4% y se probaron varios aditivos para mejorar las características de adherencia de los formulados, para esto se incorporó la cepa de BT (GM-10) al 10% el aditivo adherente a probar al 2%, y utilizando como soporte de formulación, polímeros naturales (Capsul® Gelatina), (Tabla 4.) cuatro Tratamientos con Bt y cuatro sin él.

Durante el secado por aspersión ocurren diferentes etapas para la deshidratación de las gotas dentro del Aspersor, a la salida del atomizador rotatorio donde la muestra se alimenta, produce una nube dentro, con un pequeño intervalo de tamaño de gota para ser secadas por alta temperatura con aire caliente, los materiales termosensibles se ven favorecidos ya que estos son protegidos de las altas temperaturas por enfriamiento evaporativo (Martínez 2009), para comprobar esto se realizó una cuenta de esporas de los formulados elaborados con BT y corroborar su viabilidad después del proceso de secado por aspersión, los formulados al 10% no mostraron cambios durante este sistema de secado (Tabla 12.).

Posteriormente se procedió a la realización de bioensayos de preferencia alimenticia de los distintos Tratamientos para corroborar la selección del insecto hacia estos formulados. En el bioensayo se incluyeron 9 Tratamientos, 8 corresponden a los formulados para evaluar los aditivos adherentes y el control que incluye la Hoja de Nogal fresca. Los resultados obtenidos, sometidos al análisis de varianza presentan altas diferencias significativas entre ellos ( $F= 9.214$ ,  $gl= 8$ ,  $P<0.001$ ); y la prueba de Tuckey nos da dos niveles de significancia (Tabla 13). La comparación de medias mostró que las formulaciones que corresponden a los Tratamientos 8, 1 y 3, en este orden, son las más aceptadas por las larvas con  $4.78 \pm 0.470$ ,  $4.70 \pm 0.474$  y  $4.68 \pm 0.487$  respectivamente.

Tabla 12. Determinación de la Cuenta de Esporas de los Formulados Asperjables de *Bacillus thuringiensis*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO	Medias de UFC/ml $\pm$ DEa
1	Bt GG	$12.2 \pm 5.5$
2	Bt GX	$13.8 \pm 7.0$
3	Bt GC	$12.3 \pm 4.7$
4	Bt S/A	$11.6 \pm 4.4$

a=UFC expresados  $10^8$ /ml de Biomasa. n=3

Para analizar la presencia de *B. thuringiensis* en los Formulados Asperjables se realizó un análisis comparativo de varianza (Tabla 14.) donde

Tabla 13.- Evaluación de los Formulados Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADOS	Media del número de larvas $\pm$ EE <sup>n</sup>	RP
CONTROL	HN	7.63 $\pm$ 0.497 <sup>a</sup>	1°
8	sBt S/A	4.78 $\pm$ 0.470 <sup>b</sup>	2°
1	Bt GG	4.70 $\pm$ 0.474 <sup>b</sup>	2°
3	Bt GC	4.68 $\pm$ 0.487 <sup>b</sup>	2°
5	sBt GG	3.93 $\pm$ 0.484 <sup>b</sup>	2°
2	Bt GX	3.70 $\pm$ 0.481 <sup>b</sup>	2°
4	Bt S/A	3.48 $\pm$ 0.442 <sup>b</sup>	2°
7	sBt GC	3.15 $\pm$ 0.363 <sup>b</sup>	2°
6	sBt GX	2.85 $\pm$ 0.503 <sup>b</sup>	2°

n= 360, (número total de larvas utilizadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3. para la composición del Formulado. RP= Rango de Preferencia. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P  $\leq$  0,01.

Tabla 14.- Efecto de la presencia o ausencia de *B. thuringiensis* en las Formulaciones Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.

	Media del número de larvas $\pm$ EE
CON Bt <sup>n1</sup>	4.14 $\pm$ 0.243
SIN Bt <sup>n2</sup>	4.47 $\pm$ 0.236

(Número total de larvas utilizadas en el experimento); **n1**= 160, Tratamientos 1, 2, 3 y 4. **n2**= 200, Tratamientos 5, 6, 7 y 8. Prueba de Tukey HSD,  $p \leq 0,05$ .

muestra que no hay diferencia significativa con la presencia de BT en los formulados (F= 0.917, gl= 1, P= 0.339). Los resultados de los Tratamientos muestran que *H. cunea* consume el formulado tanto con BT como sin este, el encapsulado no permite distinguir el sabor de BT, lo que facilita la ingestión del ingrediente activo.

Por otra parte se analizó la presencia de aditivos y sin ellos en los Formulados Asperjables (Tabla 15.), mediante análisis comparativo de varianza se encontró que no presenta diferencia significativa de las larvas atraídas hacia cualquiera de los formulados con o sin aditivo. Nuevamente, *H. cunea* consume el formulado tanto con aditivo como sin él, el sistema microencapsulado, facilita la ingestión del formulado por parte del insecto (F= 0.536, gl= 1, P= 0.465).

Se realizó también una comparación entre los formulados con los aditivos sin BT para medir la aceptación de un aditivo en particular, por las larvas de *H. cunea*, y el número de larvas atraídas, muestra la preferencia de estas hacia el aditivo Goma de Guar, (Tratamiento 5) con  $4.31 \pm 0.338$  larvas, ( $F= 2.393$ ,  $gl= 2$ ,  $P= 0.094$ ), aunque sin diferencia significativa, y corroborado por la prueba de Tuckey, donde solo arroja un nivel de significancia (Tabla 16.).

Tabla 15.- Efecto de la presencia o ausencia de aditivos en las Formulaciones Asperjables atractivos para *Hyphantria cunea*.

	Media del número de larvas $\pm$ EE
SIN ADITIVO <sup>n1</sup>	$4.13 \pm 0.359$
CON ADITIVO <sup>n2</sup>	$3.83 \pm 0.196$

(Número total de larvas usado en el experimento). **n1**= 80, Tratamientos 4. **n2**=240, Tratamientos 1, 2 y 3. Prueba de Tukey HSD,  $p \leq 0,05$ .

Tabla 16.- Efecto de la presencia de las gomas como aditivos en los Formulados Asperjables sobre la preferencia alimenticia de *Hyphantria cunea*.

ADHERENTE <sup>a</sup>	Media del número de larvas $\pm$ EE <sup>n</sup>
GG	$4.31 \pm 0.338^a$
GC	$3.91 \pm 0.346^a$
GX	$3.28 \pm 0.330^a$

(número total de larvas utilizadas en el experimento) **n**= 240, Tratamientos 5, 6 y 7. **a**= Refiérase a la Tabla 3. para la composición del Formulado. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

La palatabilidad puede ser un factor importante cuando se utilizan biopolímeros para encapsular entomopatógenos que deben ser ingeridos por el insecto para ser efectivos (Morales-Ramos et al. 1998), sin embargo los Tratamientos muestran que *H. cunea* consume el formulado tanto con BT como sin él (Tabla 14), con aditivo y sin él (Tabla 15), y tiene preferencia por el aditivo Goma de Guar sin BT (Tabla 16), sin diferencia significativa, y corroborado como el encapsulado no permite distinguir el sabor del entomopatógeno.

**Evaluación de la Actividad Insecticida de los Formulados Asperjables.** Se determinó la actividad insecticida a los diferentes formulados desarrollados con la presencia de los aditivos evaluados. En la Tabla 17 se muestra la dosis letal media ( $CL_{50}$ ) causada por las Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* mediante análisis Probit, donde se observa que la actividad insecticida se mantiene en valores por debajo de 0.05 ng de Bt/cm<sup>2</sup> esto debido al ajuste de las dosis, sin embargo el Tratamiento 4 (Bt S/A) presenta un valor más bajo que los demás (0.016 ng de Bt/cm<sup>2</sup>) (Pendiente = 1.38,  $X^2 = 7.57$ , gl = 6). Este Tratamiento no tiene aditivo, por lo que probablemente se incremente la presencia del ingrediente activo en la dosis empleada durante el bioensayo. Por otro lado los Tratamientos 1, 2 y 3 (Bt GG, BtGX y Bt GC) presentan  $CL_{50}$  similares entre ellas (Tabla 17).

Tabla 17. Actividad Insecticida de las Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Pendiente ± DE	Susceptibilidad (95% LC)*	X <sup>2</sup> (gl)	(X <sup>2</sup> /gl)
			CL <sub>50</sub>		
1	Bt GG	1.33±0.26	0.047 (0.021-0.126)	5.47 (5)	1.09
2	Bt GX	1.57±0.27	0.041 (0.026-0.070)	4.33 (6)	0.722
3	Bt GC	1.98±0.33	0.044 (0.026-0.092)	6.86 (6)	1.144
4	Bt S/A	1.38±0.32	0.016 (0.006-0.035)	7.57 (6)	1.26

\* Expresadas en nanogramos de proteína activa de Bt/cm<sup>2</sup> de dieta artificial, LC, límites de confianza. (gl), grados de libertad. (X<sup>2</sup> /gl), heterogeneidad. a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Tratamientos 1, 2, 3 y 4.

**Evaluación de la Vida de Anaquel de las Formulaciones.** Se monitoreó la estabilidad de los formulados para determinar vida de anaquel después de 6 meses de almacén, se efectuaron bioensayos cada 3 meses durante 9 meses consecutivos, donde se encontró variación de la mortalidad, principalmente un incremento en las dosis de mortalidad con respecto a la original (Tabla 18.), solo el formulado con Goma Xantana Tratamiento 2, conservó una dosis muy similar a la original (de 0.041 a 0.047 ng de Bt/cm<sup>2</sup>) aun así el análisis ANOVA de las formulaciones no presentan diferencias significativas (F= 1.898, gl= 3, P= 0.151), mostrando con ello la estabilidad del formulado.

Tabla 18. Efecto de las condiciones de almacenamiento sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Media de CL <sub>50</sub> ± DE
1	Bt GG	0.071±0.025a
2	Bt GX	0.047±0.014a
3	Bt GC	0.039±0.041a
4	Bt S/A	0.060±0.032a

n= 34, (número total de resultados de CL<sub>50</sub> usados en el análisis). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística

Al analizar la toxicidad de los formulados almacenados a temperatura ambiente, se conserva su actividad, y al corroborarlo con la prueba de Tukey que muestra que no existe diferencias significativas entre ellos, (F= 0.628,

gl= 3, P= 0.606) (Tabla 19.). El Tratamiento 2, (Goma Xantana) nuevamente conservó una dosis muy similar a la original.

Tabla 19. Efecto del almacenamiento a Temperatura Ambiente sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Media de CL <sub>50</sub> ± DE
1	Bt GG	0.065±0.024a
2	Bt GX	0.043±0.006a
3	Bt GC	0.048±0.050a
4	Bt S/A	0.039±0.025a

n= 22, (número total de resultados de CL<sub>50</sub> usados en el análisis). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulador. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤ 0,05.

Por otro lado, el efecto de la temperatura de refrigeración para almacenaje, si afecta a los distintos Tratamientos, presentando diferencias significativas entre ellos (F= 8.024, gl= 3, P< 0.001), sin embargo se presenta de un incremento de la dosis letal media en el Tratamiento 4 (Bt S/A) (0.082 ng de Bt/cm<sup>2</sup>) (Tabla 20.) y al analizar la prueba de Tuckey, se obtienen dos grupos de significancia.

Se efectuó también un análisis ANOVA para determinar si existen diferencias en las CL<sub>50</sub> de los formulados almacenados a temperatura ambiente y temperatura de refrigeración, y no se observan diferencias significativas mediante análisis (F= 0.425, gl= 1, P= 0.519), (Tabla 21.).

Tabla 20. Efecto del almacenamiento a Temperatura de Refrigeración sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Media de LC <sub>50</sub> ± DE
1	Bt GG	0.090±0.025b
2	Bt GX	0.056±0.022ab
3	Bt GC	0.025±0.007a
4	Bt S/A	0.082±0.022b

n=12, (número total de resultados de LC<sub>50</sub> usados en el análisis). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

Tabla 21. Efecto de la Temperatura de almacenamiento sobre la Dosis Letal media de Formulaciones Asperjables de *B. thuringiensis* contra *Hyphantria cunea*.

TEMPERATURA	Media de CL <sub>50</sub> ±DE
AMBIENTE <sup>N1</sup>	0.050±0.032
REFRIGERACION <sup>N2</sup>	0.058±0.032

n1=22 n2=12, (número total de resultados de CL<sub>50</sub> usados en el análisis). Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

La estabilidad de los formulados elaborados con almidón modificado se hace evidente, ya que las formulaciones a base de *B. thuringiensis* encapsuladas en almidón, tienen una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias, la persistencia de *B. thuringiensis* en campo depende

en gran medida del tipo de formulación, es decir, de los soportes o aditivos utilizados para tal fin (McGuire *et al.* 1994).

**Determinación de Suspensibilidad de los Formulados Asperjables.** Para favorecer la suspensibilidad de los polvos humectables, se utilizan agentes de suspensión o dispersantes, estos actúan normalmente elevando ligeramente la viscosidad del agua que sirve de vehículo, retardando así la caída de las partículas al fondo del recipiente, estas pueden ser gomas, caseínatos, albuminas, carragenanos, almidón, celulosa, sulfonatos de lignina, naftaleno, o bien sustancias sintéticas (Morales-Ramos 1996). El objetivo de esta prueba fue determinar el tiempo que duran en suspensión los formulados asperjables al ser disueltos en agua y calcular la cantidad de ingrediente activo suspendido en un medio acuoso después de un tiempo establecido de reposo en una probeta de altura específica, el resultado se expresa como porcentaje de ingrediente activo en suspensión, se establecieron tiempos desde 0 h hasta 8 h, los resultados se graficaron y los Formulados elaborados presentan arriba del 90% de suspensibilidad, el formulado comercial Dipel ligeramente por debajo de ellos. También se incluyó en el análisis a la cepa GM-10 la cual no está formulada y se utilizó como método de recuperación del complejo spora-cristal, el método de Dulmage *et al.* 1970, que consiste en una coprecipitación con Lactosa Acetona (L-A), para compararlo con los Formulados Asperjables; este formulado precipita hasta el 42% del contenido de la probeta (Figura 13.). El

peso de las partículas suspendidas en la muestra se sometió a un análisis de varianza (ANOVA), así como una prueba de Tukey y se comparó la media de las partículas extraídas. En el análisis estadístico presenta que el formulado comercial Dipel y el formulado con Lactosa Acetona son los que precipitan más rápidamente, (Tabla 22.) con el mayor peso de partículas en el fondo, solo se encontró diferencia significativa con el formulado obtenido (L-A) con respecto a los demás formulados ( $F= 32.224$ ,  $gl= 10$ ,  $P< 0.001$ ).

Tabla 22. Suspensibilidad, Media de las partículas reconstituidas (gr/ml) de los Formulados evaluados.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA ± DE
1	Bt GG	0,0113 ± 0.0031a
2	Bt GX	0.0108 ± 0.0016a
3	Bt GC	0.0102 ± 0.0015a
4	Bt S/A	0.0098 ± 0.0011a
5	sBt GG	0.0098 ± 0.0018a
6	sBt GX	0.0106 ± 0.0025a
7	sBt GC	0.0097 ± 0.0011a
8	sBt S/A	0.0100 ± 0.0025a
Formulado Comercial	DIPEL	0.0126 ± 0.0061a
Lactosa Acetona	L-A*	0.3891 ± 0.189b
Control	AGUA	0.000 ± 0.000a

n=88, (número total de muestras usadas en el experimento). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Extracto de GM-10 procesado con Lactosa Acetona. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

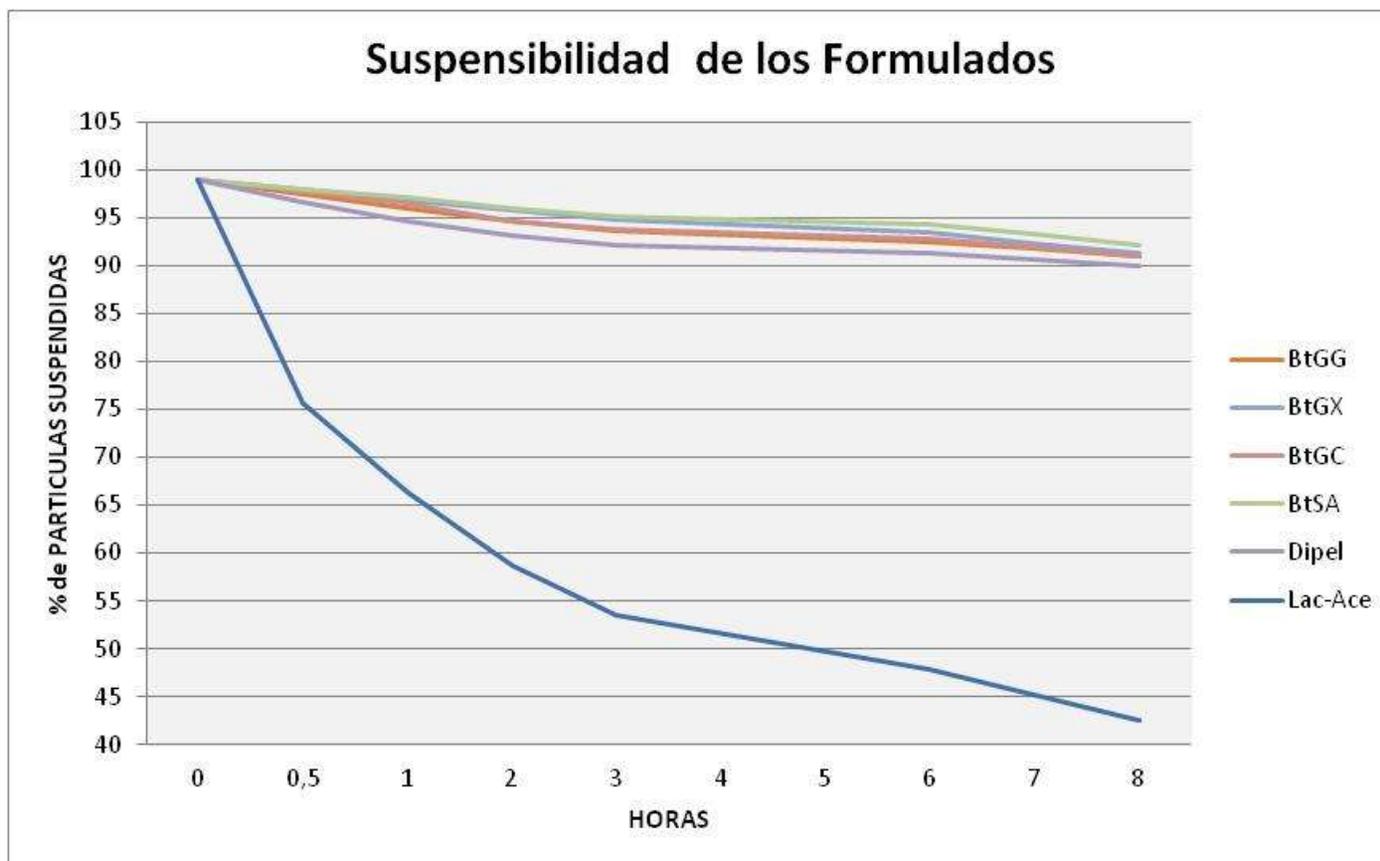


Figura 13. Suspensibilidad de los Formulados elaborados con *B. thuringiensis* y el procesado con Lactosa Acetona (L-A) en porciento de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.

Se realizó un análisis para comparar los formulados elaborados con el polímero (Capsul®–Gelatina), 8 Tratamientos, y observar si entre ellos presentaban diferencias significativas ( $F= 0.625$ ,  $gl= 7$ ,  $P=0.733$ ), no hay diferencias, y la media de las partículas suspendidas con la prueba de Tukey da un solo nivel de significancia (Tabla 23.).

Tabla 23. Media de las partículas suspendidas (gr / ml) de los Formulados Asperjables en presencia o ausencia de *B. thuringiensis*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA ± DE
1	Bt GG	0.0113 ± 0.0031a
2	Bt GX	0.0108 ± 0.0016a
3	Bt GC	0.0102 ± 0.0015a
4	Bt S/A	0.0098 ± 0.0011a
5	sBt GG	0.0098 ± 0.0018a
6	sBt GX	0.0106 ± 0.0025a
7	sBt GC	0.0097 ± 0.0011a
8	sBt S/A	0.0100 ± 0.0025a

n=64, (número total de muestras usadas en el experimento). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

Para hacer una comparación de los Tratamientos con respecto al extracto recuperado con lactosa acetona (L-A) de la cepa GM-10, y determinar si la presencia de BT en los formulados influye en la floculación

de las partículas, se efectuó el análisis y este mostro una alta diferencia significativa, ( $F= 32.072$ ,  $gl= 4$ ,  $P<0.001$ ), la prueba de Tukey muestra dos niveles de significancia (Tabla 24.), observando que los Tratamientos con el polímero (Capsul®–Gelatina), favorece la suspensibilidad, no así para L-A. Sin embargo en los Tratamientos formulados con BT comparados con el producto comercial Dipel, se obtuvo que no hay diferencia significativa aunque este se muestra ligeramente debajo de los Tratamientos con polímero (Capsul®–Gelatina), (Figura 14.) y el análisis estadístico presenta un solo nivel de significancia en la prueba de Tukey ( $F= 0.913$ ,  $gl= 4$ ,  $P=0.467$ ) (Tabla 25.).

Tabla 24. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr / ml) de los Formulados Asperjables con *B. thuringiensis* y Formulado con Lactosa Acetona.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA ± DE
1	Bt GG	0.0113 ± 0.0031a
2	Bt GX	0.0108 ± 0.0016a
3	Bt GC	0.0102 ± 0.0015a
4	Bt S/A	0.0098 ± 0.0011a
Lactosa Acetona	L-A*	0.3891 ± 0.189b

n=40, (número total de muestras usadas en el experimento). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Extracto de GM-10 procesado con Lactosa Acetona. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0.05$ .

Tabla 25. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr / ml) de los Formulados Asperjables con *B. thuringiensis* y Formulado Dipel.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA ± DE
1	Bt GG	0.0113 ± 0.0031a
2	Bt GX	0.0108 ± 0.0016a
3	Bt GC	0.0102 ± 0.0015a
4	Bt S/A	0.0098 ± 0.0011a
Formulado Comercial	DIPEL	0.0126 ± 0.0061a

n=40, (número total de muestras usadas en el experimento). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

Se realizó un análisis de varianza del peso de las partículas suspendidas de los Tratamientos sin BT y no presentan diferencia significativa entre ellos ( $F= 0.292$ ,  $gl= 3$ ,  $P=0.831$ ) y la prueba de Tukey da un nivel de significancia (Tabla 26). La Figura 15. se distingue la trayectoria que siguen los Tratamientos sin BT y presenta el mismo resultado que aquellos que se formulan con BT, de modo que estas similitudes prueban como entre los distintos Tratamientos la característica en común es la mezcla de polímeros (Capsul®–Gelatina), y esta clase de formulados presentados en forma de polvo capaz de ser mojado y mantenerse en suspensión en agua durante tiempos más o menos razonables, cumple con el criterio a conseguir la mejor eficiencia del producto una vez aplicado, de

manera uniforme en el sitio donde va a actuar (Morales-Ramos 1996). El uso de estos ingredientes asegura que las formulaciones insecticidas sean efectivamente ingeridas por el insecto y debido a que provienen de fuentes naturales, los peligros de contaminación por su liberación al ambiente son mínimos o nulos. De hecho, las hojas o cáscaras o algunos otros residuos derivados de la industria alimenticia, pueden ser ampliamente utilizados en el desarrollo de estos productos, evitando de esta manera la acumulación de residuos en el ambiente (Rosas-García y Luna-Santillana 2006).

Tabla 26. Comparación de la Media de las partículas suspendidas (gr / ml) de los Formulados Asperjables sin *B. thuringiensis*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA ± DE
5	sBt GG	0,0098 ± 0,0018a
6	sBt GX	0,0106 ± 0,0025a
7	sBt GC	0,0097 ± 0,0011a
8	sBt S/A	0,0100 ± 0,0025a

n=32, (número total de muestras usadas en el experimento). a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

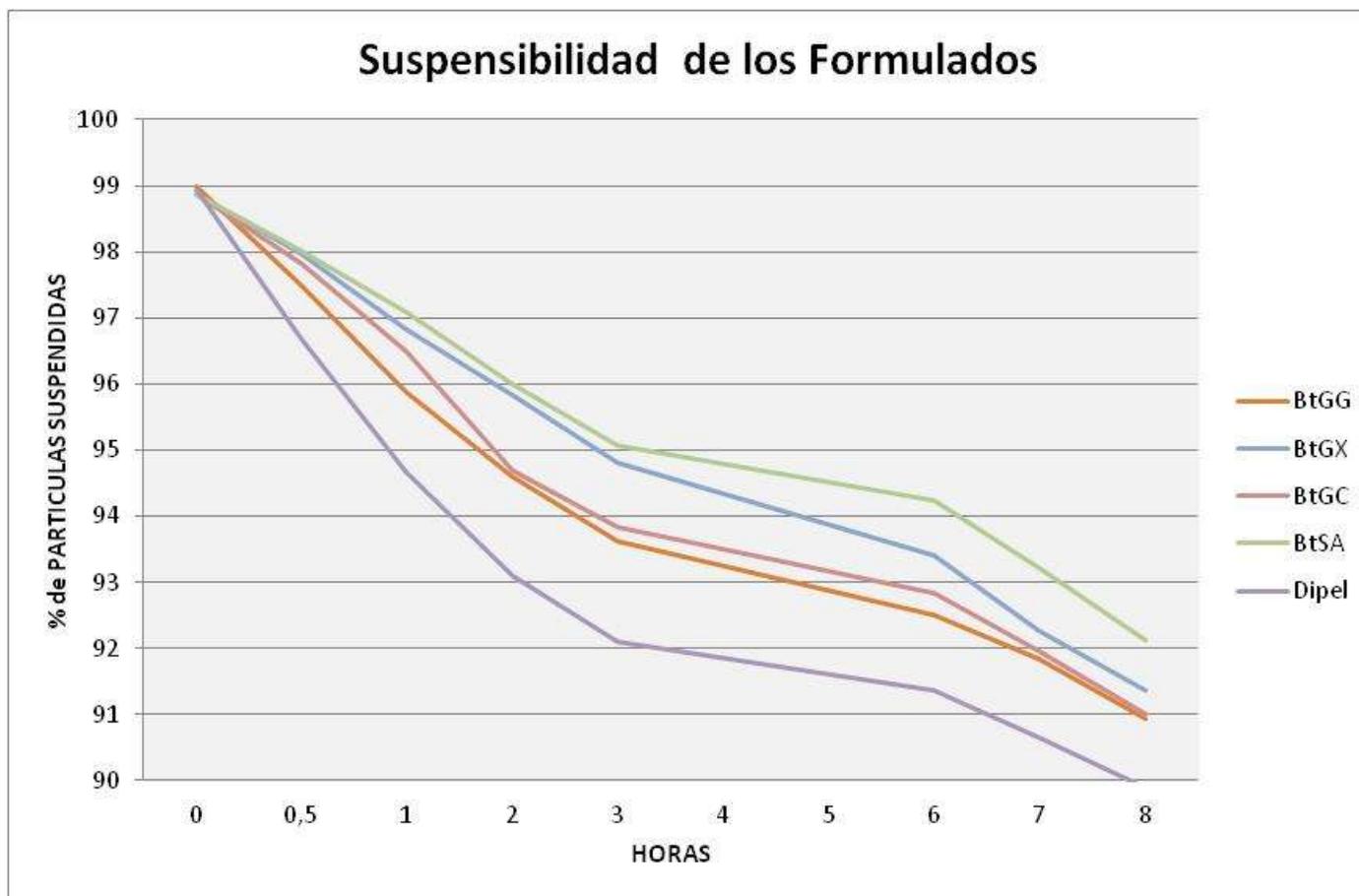


Figura 14. Suspensibilidad de los Formulados elaborados con *B. thuringiensis* y Formulado Comercial Dipel, en porciento de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.

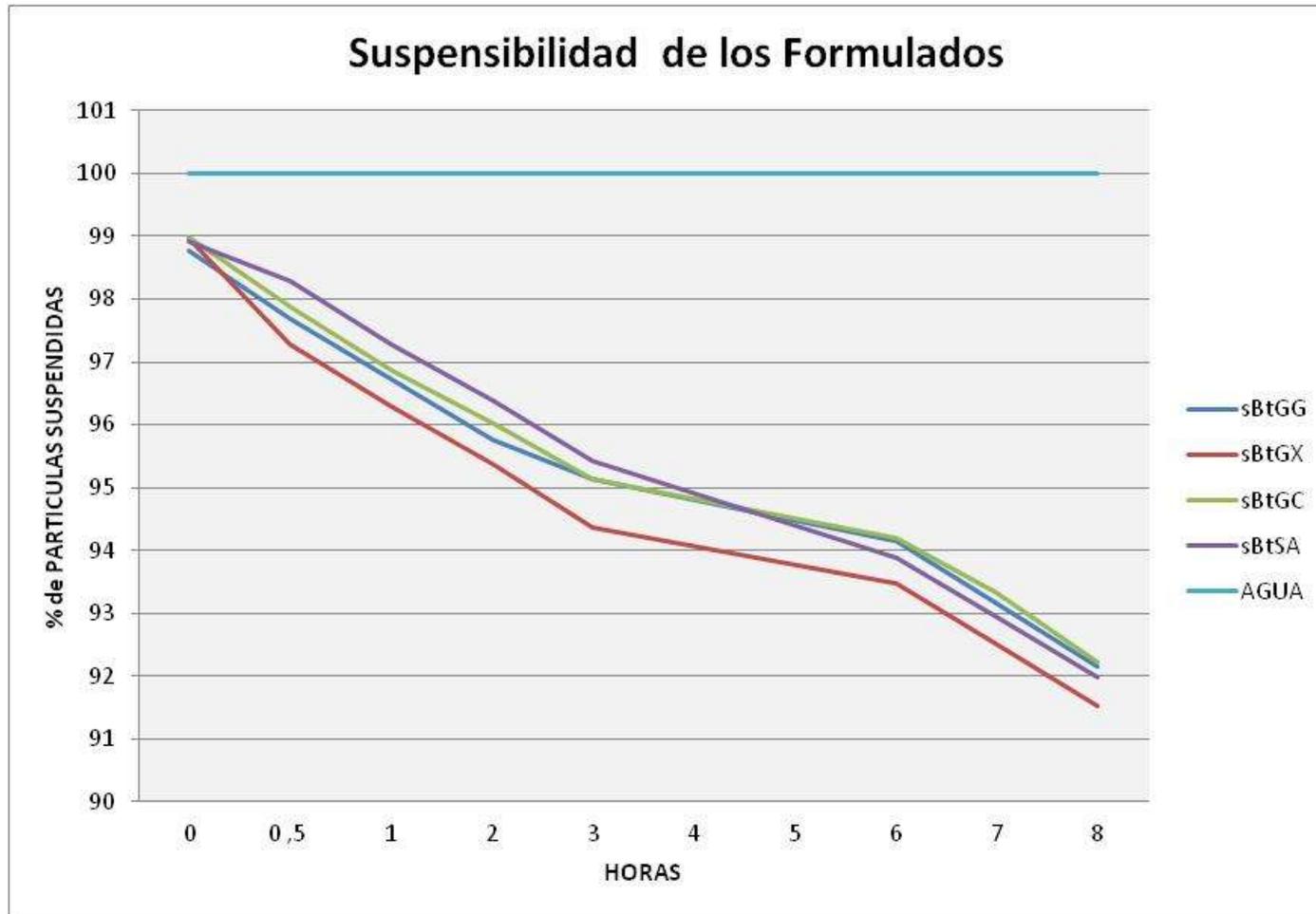


Figura 15. Suspensibilidad de los Formulados elaborados sin *B. thuringiensis* y el control Agua en porcentaje de las partículas suspendidas en la probeta contra tiempo.

**Factibilidad de Aspersión de los Formulados.** Para determinar si los formulados atraviesan la boquilla de un aspersor se llevó a cabo una prueba que consiste en hacer pasar los formulados reconstituidos en agua a una concentración de principio activo del 10%. La factibilidad de aspersión se midió utilizando un aspersor SMI® de 50 ml de capacidad, el cual tiene una boquilla de una apertura de 0.5  $\mu\text{m}$  y trabaja a una presión de 5 lb, los formulados se hicieron pasar bajo estas condiciones. Los resultados mostraron la factibilidad para todos los Tratamientos, ya que pasaron a través de la boquilla sin dificultad. (Figura 16.).



Figura 16. Factibilidad de Aspersión de los Formulados Asperjables de *B. thuringiensis* utilizando un aspersor con boquilla de apertura 0.5  $\mu\text{m}$  y 5 lb de presión.

**Determinación de la Adherencia de los Formulados a portaobjetos.** El desarrollo de formulaciones de *Bacillus thuringiensis* asperjables y con características adherentes, que forme una película con el

plaguicida encapsulado sobre la superficie de la hoja y con una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias, puede ayudar mucho cuando se trata de cultivos de campo. Se han utilizado diferentes tipos de almidón de maíz pregelatinizado y adyuvantes, logrando éxito para estas formulaciones, ya que presenta ventajas sobre otros soportes. Esta película puede durar de 1 a 21 días en condiciones de invernadero dependiendo del tipo de almidón pregelatinizado (McGuire *et al.* 1994; McGuire y Shasha 1990). Se evaluaron las propiedades adherentes de los diferentes formulados en portaobjetos. Se utilizó como control positivo el adherente comercial; Bionex® solo y mezclado Con BT, en la prueba también se incluyó el Dipel, los Tratamientos con los diferentes adherentes Sin BT y Con BT y como control negativo agua. El Tratamiento 2 (Bt GX), presento la mejor adherencia con el mayor peso de partículas adheridas al portaobjetos, con un solo nivel de significativa con respecto al resto de los Tratamientos incluyendo al adherente comercial ( $0,00319 \pm 0,00202$ ). Entre los diferentes Tratamientos existe una alta diferencia significativa ( $F= 11.170$ ,  $gl= 11$ ,  $P<0.001$ ) y la prueba de Tukey, muestra tres niveles de significancia (Tabla 27.), donde nueve de los formulados comparten el nivel.

Al comparar todos los formulados Sin BT se encontró que el formulado comercial (Bionex®) y el formulado con goma Xantana Sin BT comparten nivel de significancia, por lo que se puede concluir que la presencia de BT en

Tabla 27. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables y comerciales.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA* ± DE	Ranquin Adherencia
2	Bt GX	0,00319 ± 0,00202 a	1°
Aditivo Comercial sin BT	Bionex®	0,00132 ± 0,00096 b	2°
6	sBt GX	0,00088 ± 0,00101 bc	3°
3	Bt GC	0,00080 ± 0,00037 bc	4°
Aditivo Comercial con BT	Bionex® BT	0,00068 ± 0,00109 bc	5°
5	sBt GG	0,00048 ± 0,00029 bc	6°
7	sBt GC	0,00045 ± 0,00035 bc	7°
4	Bt S/A	0,00036 ± 0,00013 bc	8°
Formulado Comercial	DIPEL	0,00032 ± 0,00010 bc	9°
8	sBt S/A	0,00031 ± 0,00017 bc	10°
1	Bt GG	0,00024 ± 0,00014 bc	11°
Control	AGUA	0,00000 ± 0,00001 c	12°

n= 120. (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Media del peso adherido (g) a los portaobjetos. Bionex® = adherente comercial. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

Tabla 28. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables sin *B. thuringiensis*, y el adherente comercial Bionex®.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA* ± DE
Aditivo Comercial sin BT	Bionex®	0,00132 ± 0,00096 a
6	sBt GX	0,00088 ± 0,00101 ab
5	sBt GG	0,00048 ± 0,00029 b
7	sBt GC	0,00045 ± 0,00035 b
8	sBt S/A	0,00031 ± 0,00017 b

n= 50. (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulador. \* Media del peso adherido (g) a los portaobjetos. Bionex® = adherente comercial. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

los formulados altera las características de adherencia del mismo ( $F= 3.889$ ,  $gl= 4$ ,  $P=0.009$ ) mostrando dos niveles de significancia (Tabla 28.).

Cuando se compararon solamente los formulados con los diferentes adherentes sin el adherente comercial, se encontró que no existe diferencia significativa en los Tratamientos sin BT ( $F= 1.908$ ,  $gl= 3$ ,  $P=0.146$ ) (Tabla 29.) y la prueba de Tukey presenta solo un nivel de significancia, esto comprueba que la presencia de un adherente en la formulación es necesario y por otro lado la presencia de BT afecta las características de adherencia en los formulados, aun así la goma Xantana (sBt GX) muestra mayor adherencia.

Tabla 29. Determinación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables sin *B. thuringiensis*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA* ± DE
6	sBt GX	0,00088 ± 0,00101 a
5	sBt GG	0,00048 ± 0,00029 a
7	sBt GC	0,00045 ± 0,00035 a
8	sBt S/A	0,00031 ± 0,00017 a

n= 40. (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Media del peso adherido (g) a los portaobjetos. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

Por otro lado al analizar los formulados Con BT y compararlos con el Tratamiento que contiene el adherente comercial Bionex®, mostro que hay una alta diferencia significativa ( $F= 14.010$ ,  $gl= 5$ ,  $P<0.001$ ) (Tabla 30.) y dos niveles de significancia, donde el comercial Bionex®, queda en tercer posición. Se repitió este análisis, ahora sin el comercial y presento el mismo efecto con una alta diferencia significativa ( $F= 18.433$ ,  $gl= 4$ ,  $P<0.001$ ) y dos niveles de significancia en la prueba de Tukey, (Tabla 31.) donde el primer lugar de adherencia esta nuevamente el Tratamiento 2. Esto demuestra como los distintos Tratamientos compiten el grado de adherencia con el comercial Bionex®.

Tabla 30. Comparación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables, el comercial Dipel y el adherente comercial Bionex®.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA* ± DE
2	Bt GX	0,00319 ± 0,00202 a
3	Bt GC	0,00080 ± 0,00037 b
Aditivo Comercial con BT	Bionex® Bt	0,00068 ± 0,00109 b
4	Bt S/A	0,00036 ± 0,00013 b
Formulado Comercial	DIPEL	0,00032 ± 0,00010 b
1	Bt GG	0,00024 ± 0,00014 b

n= 60. (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Media del peso adherido (g) a los portaobjetos. Bionex® = adherente comercial. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

Tabla 31. Evaluación de las propiedades Adherentes de los Formulados Asperjables con *B. thuringiensis* y Formulado comercial Dipel.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	MEDIA* ± DE
2	Bt GX	0,00319 ± 0,00202 a
3	Bt GC	0,00080 ± 0,00037 b
4	Bt S/A	0,00036 ± 0,00013 b
Formulado Comercial	DIPEL	0,00032 ± 0,00010 b
1	Bt GG	0,00024 ± 0,00014 b

n= 50. (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. \* Media del peso adherido (g) a los portaobjetos. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

**Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones en Invernadero.** La persistencia de una formulación, ante la lluvia o la radiación solar es favorecida por el uso de adherentes y las formulaciones a base de *B. thuringiensis* encapsuladas en almidón, tienen una actividad residual mayor, aún en temporada de lluvias (Rosas-García y Luna-Santillana 2006).

La finalidad de este bioensayo fue la determinación de la persistencia de los formulados en las hojas de nogal bajo condiciones de lluvia simulada y sin lluvia. Se cortaron 10 trozos de hojas de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> c/u de cada planta asperjada con los Tratamientos por día, cada trozo fue colocado en caja de Petri de 5 cm de diámetro con el fondo cubierto con papel filtro húmedo y a cada trozo se le adicionaron 5 larvas, a las cuales se les permitió alimentarse de la hoja, posteriormente se evaluó la mortalidad media, esto se realizó cada tercer día. Los resultados del bioensayo con los diferentes formulados, en ausencia y presencia de lluvia, muestran que la mortalidad disminuye en presencia de lluvia, se afecta la persistencia del formulado debido al lavado por la lluvia.

La Figura 17. esquematiza el efecto de la presencia o ausencia de lluvia sobre el Tratamiento 1 (Bt GG), el cual no persistió sobre las hojas desde el primer día con lluvia simulada con  $4.1 \pm 0.433$  sin lluvia bajó a  $(2.4 \pm 0.618)$  con lluvia (día 0), y con los días continuó lavándose de sobre las hojas.

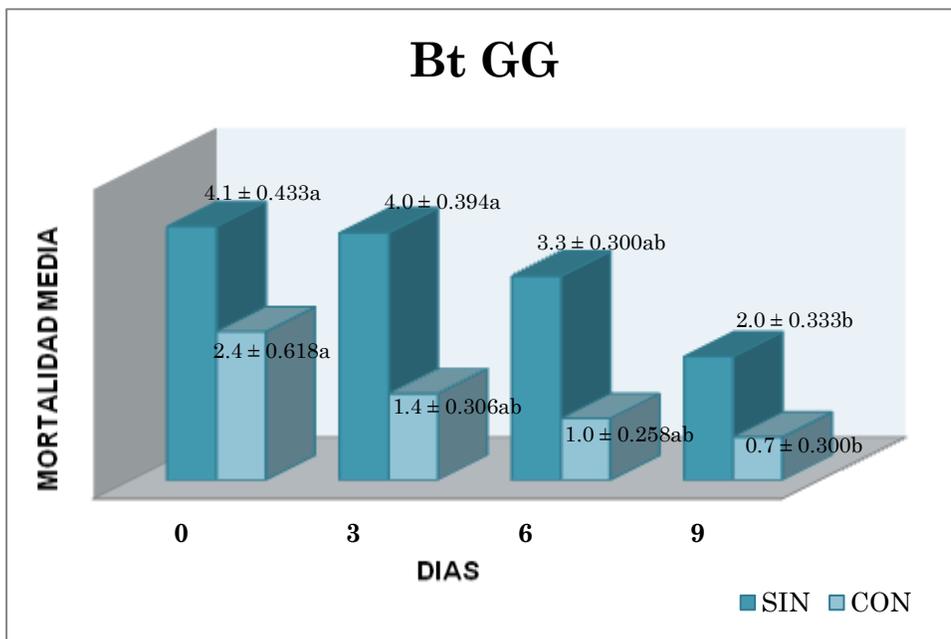


Figura 17. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt GG.

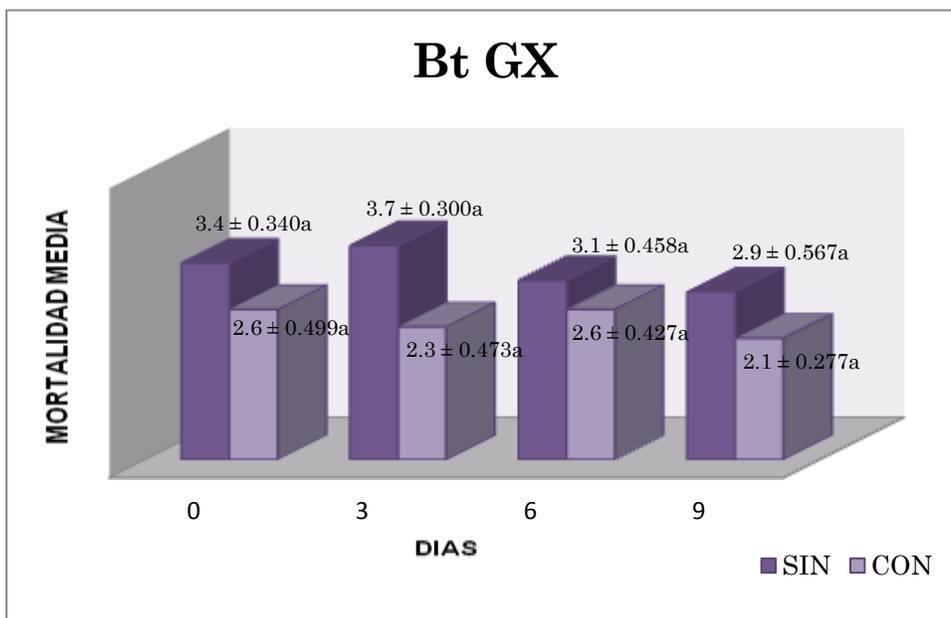


Figura 18. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado Bt GX.

Con lluvia ( $F= 3.47$   $gl= 3$   $P= 0.026$ ) y Sin lluvia ( $F= 6.88$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.001$ ) y el análisis de varianza mostró diferencias significativas y la prueba de Tukey, alinea dos niveles, uno compartido en ambos.

En el Tratamiento 2, con Goma Xantana (Bt GX) en presencia de lluvia la mortalidad es constante ( $F= 0.33$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.805$ ), sin diferencia significativa tanto en presencia de lluvia como en ausencia de esta ( $F= 0.67$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.579$ ). La mortalidad se mantiene aún con lluvia y la prueba de Tukey muestra un solo nivel de significancia (Figura 18.).

Con el Tratamiento 3 (Bt GC), (Figura 19.), mantiene un buen recubrimiento del ingrediente activo Sin lluvia ( $F= 2.02$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.129$ ), e inclusive no hay diferencia significativa, pero Con lluvia también se deslava llegando a tener una mortalidad de  $1.6 \pm 0.400$  en el último día, con una alta diferencia significativa ( $F= 4.20$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.012$ ) y la prueba de Tukey presenta dos niveles de significancia y uno compartido.

En el caso del Tratamiento 4, el cual es sin aditivo (Bt S/A), (Figura 20.) contrasta de los demás y muestra la ventaja de añadir aditivo adherente a los formulados ya que en este caso se fue perdiendo la mortalidad con los días e inclusive en ausencia de lluvia ( $F= 0.67$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.579$ ), con alta diferencia

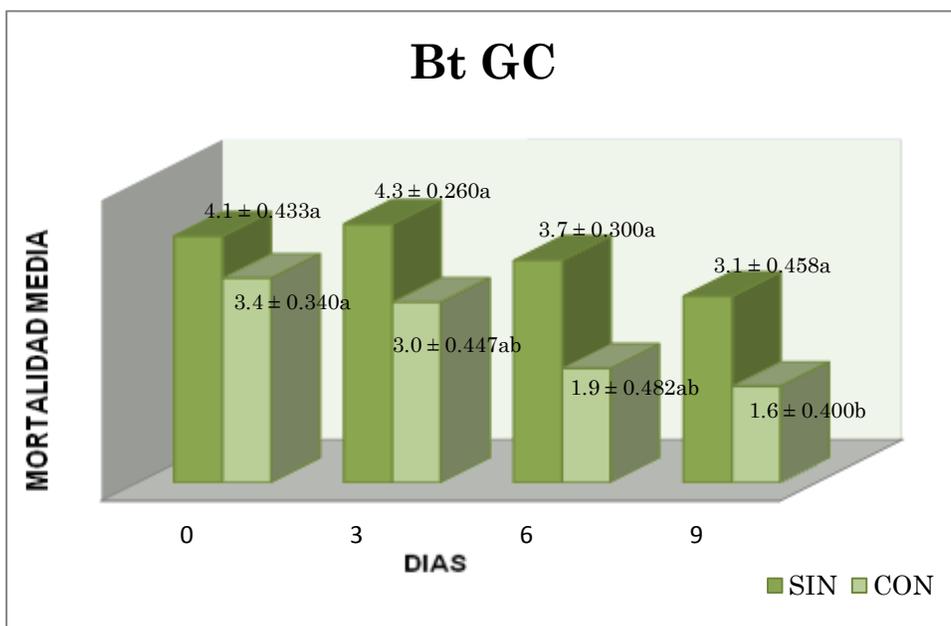


Figura 19. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formuladto Bt GC.

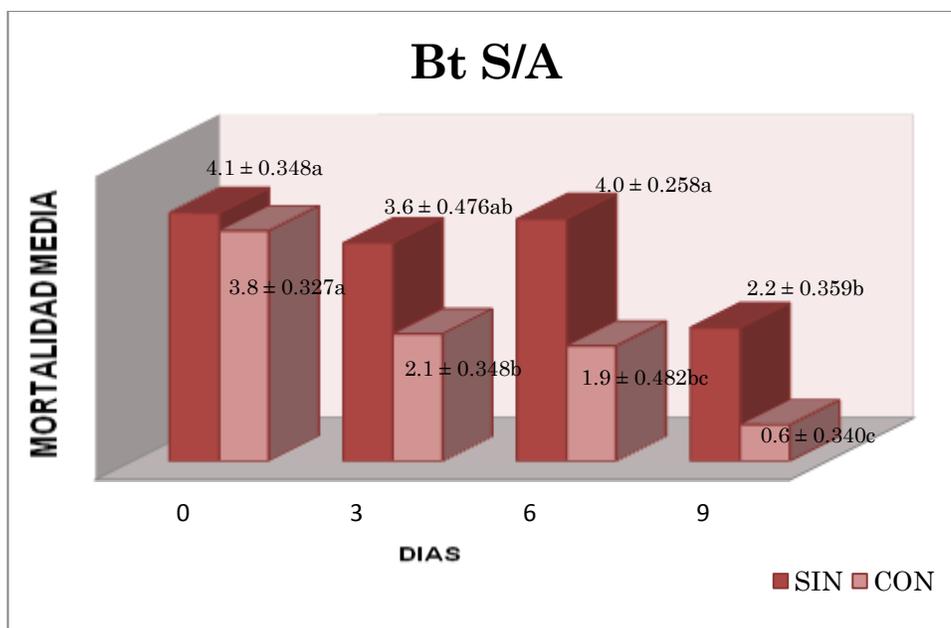


Figura 20. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formuladto Bt S/A.

significativa, y en presencia de lluvia ocurre lo mismo ( $F= 0.33$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.805$ ), Tukey con hasta tres niveles de significancia.

El Formulador Comercial Dipel (Figura 21.) Con lluvia también presentó la disminución de la mortalidad con los días, hasta  $1.7 \pm 0.448$  larvas muertas de las 5 que se colocaron originalmente con alta diferencia significativa ( $F= 5.91$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.002$ ) y en ausencia de lluvia también la mortalidad se ve que disminuye con los días ( $F= 4.43$ ,  $gl= 3$  y  $P= 0.009$ ), presentando alta diferencia significativa. Esto tratándose de un producto comercial, donde probablemente no contenga alguna sustancia que actúe como adherente, ya que este también se deslava, hasta obtener una mortalidad de  $1.7 \pm 0.448$ .

Para verificar el efecto de lluvia simulada en los Tratamientos en los formulados Sin BT, estos no presentaron mortalidad y la que se expresa es mínima sin diferencias significativas entre estos ( $P>0.05$ ). Las pruebas de Tukey de los formulados sin BT, presentan un solo nivel de significancia, y la mortalidad se debe a pérdidas más que a la presencia del formulador sobre las hojas (Figura 22.).

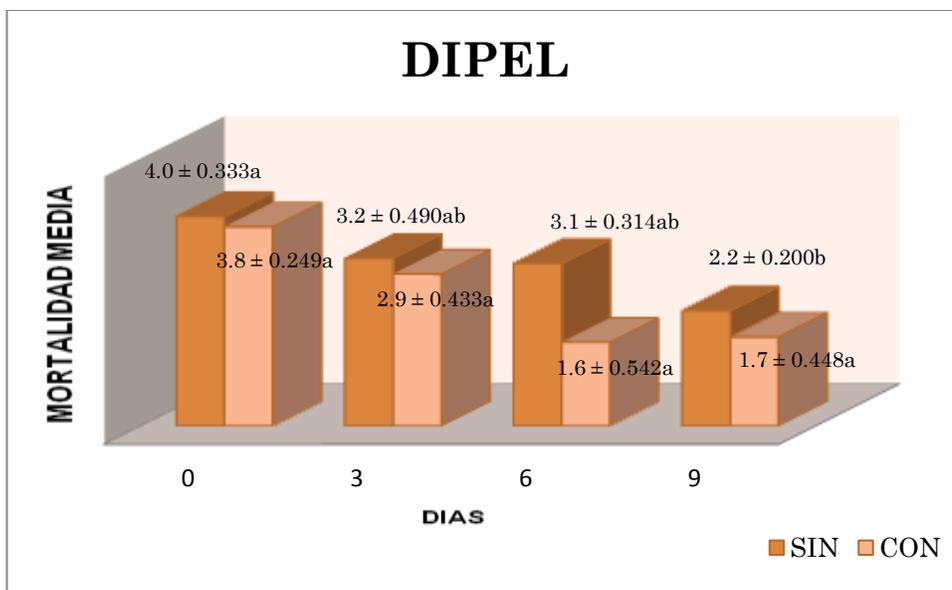


Figura 21. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con el Formulado DIPEL.

Se llevó a cabo otro análisis de varianza para determinar si existían diferencias entre los Tratamientos con lluvia y sin lluvia (Tabla 32.) con los formulados con BT. Los que se trataron Sin lluvia no hay diferencias significativas ( $F= 1.49$ ,  $gl= 4$  y  $P= 0.205$ ) con un solo nivel de significancia de la prueba de Tukey. Pero en el caso de la presencia de lluvia si muestra diferencia significativa ( $F= 4.03$ ,  $gl= 4$  y  $P= 0.004$ ) y dos niveles de significancia, uno compartido, por lo que se observa que en presencia de lluvia simulada los formulados se deslavan después de 9 días sin embargo los Tratamientos presentaron buena protección contra el lavado ya que aun después de 9 días con lluvia mostraron mortalidad, donde con 5 larvas

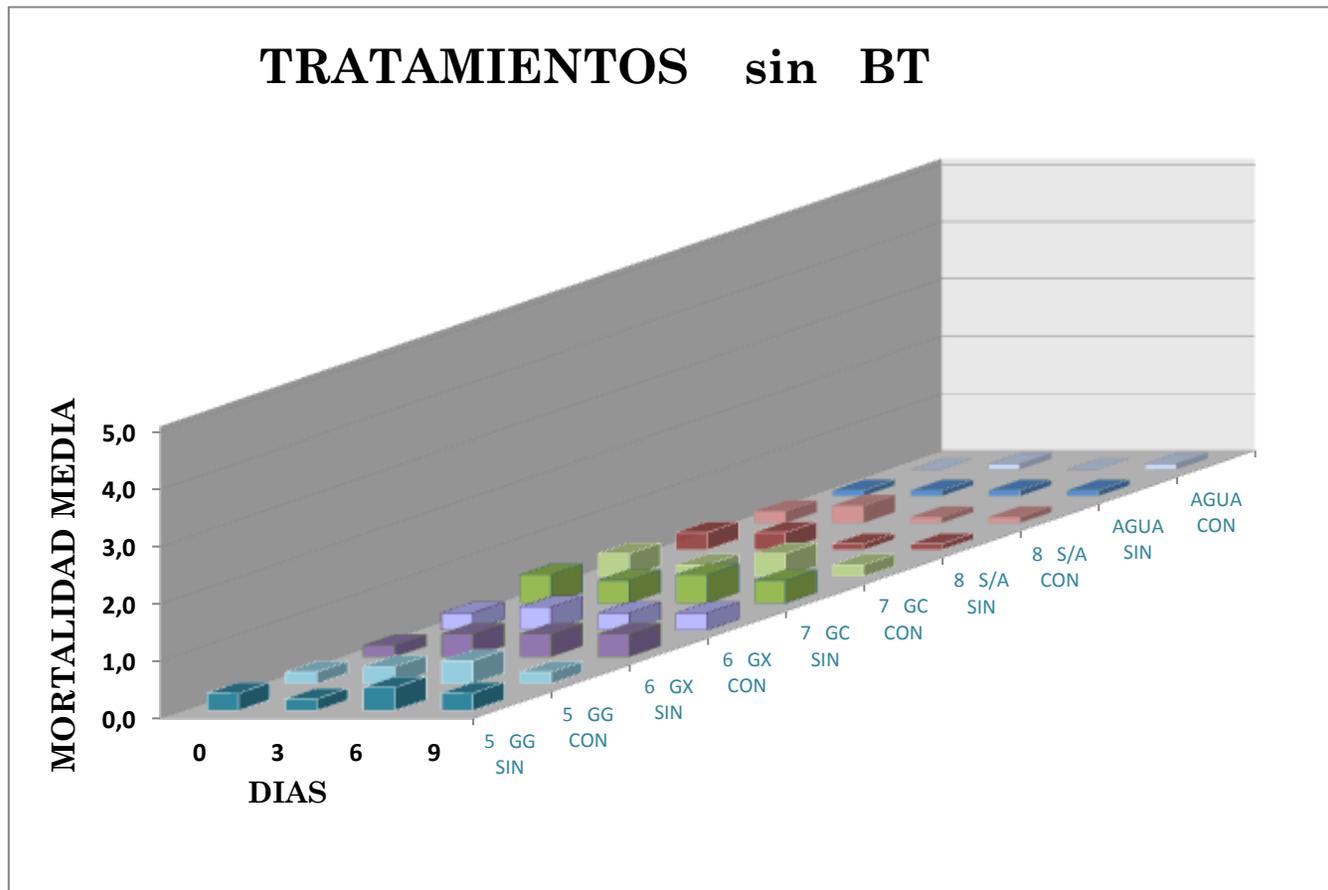


Figura 22. Efecto de la ausencia o presencia de lluvia simulada sobre la Mortalidad de larvas de *H. cunea* alimentadas de trozos de hojas asperjados con los Tratamientos 5, 6, 7, 8 sin *B. thuringiensis*, y el control AGUA.

expuestas en cada trozo de hoja, seguían matando los formulados con BT (Tabla 32.).

Y en el caso de los formulados sin BT existen entre ellos diferencias significativas tanto en ausencia ( $F= 3.20$   $gl= 4$   $P= 0.014$ ) como en presencia de lluvia ( $F= 4.56$ ,  $gl= 4$  y  $P= 0.002$ ) debido al Control con solo Agua, con dos niveles de significancia de la prueba de Tukey para ambos (Tabla 33.). La mortalidad presentada en los Tratamientos sin BT, es debida más a la perdida de larvas que a mortalidad, ya que la cuenta de esporas de los Tratamientos Sin BT resultó negativa (dato no mostrado).

Tabla 32. Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones Asperjables con *B. thuringiensis* en ausencia o presencia de lluvia simulada de sobre las hojas contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Sin lluvia	Con lluvia
		Mortalidad Media $\pm$ EE	Mortalidad Media $\pm$ EE
1	Bt GG	3.4 $\pm$ 0.222a	1.4 $\pm$ 0.217a
2	Bt GX	3.3 $\pm$ 0.212a	2.4 $\pm$ 0.208b
3	Bt GC	3.8 $\pm$ 0.193a	2.5 $\pm$ 0.235b
4	Bt S/A	3.5 $\pm$ 0.215a	2.1 $\pm$ 0.258ab
Formulado Comercial	DIPEL	3.1 $\pm$ 0.197a	2.5 $\pm$ 0.253b

n= 200 (Número total de muestras usadas en cada experimento, sin y con lluvia) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD,  $P \leq 0,05$ .

Tabla 33. Evaluación de la Persistencia de las Formulaciones Asperjables sin *B. thuringiensis* en ausencia o presencia de lluvia simulada de sobre las hojas contra *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	Sin lluvia	Con lluvia
		Mortalidad Media ± EE	Mortalidad Media ± EE
5	sBt GG	0.4 ± 0.118a	0.3 ± 0.071ab
6	sBt GX	0.4 ± 0.098a	0.3 ± 0.075ab
7	sBt GC	0.7 ± 0.198a	0.5 ± 0.119a
8	sBt S/A	0.2 ± 0.064a	0.2 ± 0.071b
Control	AGUA	0.1 ± 0.048b	0.1 ± 0.035b

n= 200 (Número total de muestras usadas en cada experimento, sin y con lluvia) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤0,05.

**Eficacia de los formulados para controlar la plaga en nidos de telaraña ya formados.** La presencia de grandes redes, antiestéticas en los arboles infectados con *H. cunea*, los hacen desmerecer, pudiendo hasta matar una rama completa del árbol. Las larvas recién eclosionan se giran, para inmediatamente tejer una tela rodeando el follaje del que se alimentan. A medida que crecen las larvas, van agrandando la telaraña para incluir más follaje. Puede haber más de una bolsa por árbol (Keith 1997). El control más eficaz es por quema, esto debido a que los pesticidas usados para su control, se les dificulta pasar por la telaraña hasta el insecto. Esta prueba se realizó con la finalidad de determinar si los formulados presentaban la capacidad para controlar la plaga en arboles pequeños los cuales se encontraban

infestados con *H. cunea*, formando pequeños nidos al asperjar los formulados al 10%. Cada árbol se infestó con 50 larvas de *H. cunea*, y se logró que los nidos se formaran en 7 días, posteriormente se asperjaron los diferentes formulados y se determinó el % de sobrevivencia de las larvas de *H. cunea* a las 24 y 48 h. En el análisis de varianza ANOVA, de los resultados encontrados con los formulados con BT, (Tabla 34.) a las 24 h ya se presentaba hasta un 70 % de Mortalidad (15.0 larvas vivas  $\pm$  2.0) para el caso del Tratamiento 1 (Bt GG) hasta un 33% de mortalidad mínima para el Tratamiento 4 (Bt S/A) con (33.5  $\pm$  0.5) larvas vivas. Sin embargo no presentaron diferencia significativa en las primeras 24 h (F= 4.16, gl= 4 y P= 0.075), con un nivel de significancia. Por otro lado en 48 h se logró el control de los nidos hasta una media de sobrevivencia entre (1.0  $\pm$  1.0) para el Tratamiento 4 (Bt S/A) y hasta (26.0  $\pm$  4.0) para el formulado Comercial Dipel, y en el análisis de varianza si hay diferencia significativa entre ellos (F= 6.88, gl= 4 y P= 0.029) y dos niveles de significancia en la prueba de Tukey. Los Tratamientos mostraron ser efectivos para controlar los nidos de telaraña ya formados, desde el primer día presentaba ya larvas muertas, por ejemplo el formulado comercial Dipel, mata rápidamente en las primeras horas pero después la mortalidad se detiene, esto por el hecho de que las larvas paran su alimentación de sobre el follaje antes de ingerir el ingrediente activo, ya que alcanzan a degustar el bioinsecticida, sin embargo los distintos Tratamientos mostraron que las larvas no lo detectan, incrementando el grado de mortalidad de los mismos, la eficiencia de la

presencia de fagoestimulantes en las formulaciones puede ser la razón de la mayor mortalidad observada con la formulación que con el producto comercial. Ciertamente el fagoestimulante cuidadosamente seleccionado da una ventaja a la formulación comprado con la formulación comercial (Rosas-García et al. 2009).

Tabla 34. Eficacia de las Formulaciones Asperjables con *B. thuringiensis* para controlar Nidos de telaraña de *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	24 HORAS	48 HORAS
		Sobrevivencia Media ± EE	Sobrevivencia Media ± EE
1	Bt GG	15.0 ± 2.0a	3.0 ± 3.0ab
2	Bt GX	33.0 ± 0.0a	19.0 ± 8.0ab
3	Bt GC	19.5 ± 7.5a	4.0 ± 1.0ab
4	Bt S/A	33.5 ± 0.5a	1.0 ± 1.0a
Formulado Comercial	DIPEL	30.0 ± 5.0a	26.0 ± 4.0b

n= 10 (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤ 0,05.

Por otro lado los Tratamientos Sin Bt, no mostraron diferencias significativas entre ellos tanto a las 24 h (F= 1.37, gl= 4 y P= 0.364) como a las 48 h. (F= 0.5, gl= 4 y P= 0.736), ambas con un solo nivel de significancia en la prueba de Tukey (Tabla 35.), las larvas de *H. cunea* permanecen en los nidos de telaraña de los arboles tratados.

Tabla 35. Eficacia de las Formulaciones Asperjables sin *B. thuringiensis* para controlar Nidos de telaraña de *Hyphantria cunea*.

TRATAMIENTOS <sup>a</sup>	FORMULADO <sup>a</sup>	24 HORAS	48 HORAS
		Sobrevivencia Media ± EE	Sobrevivencia Media ± EE
5	sBt GG	47.0 ± 0.0a	43.5 ± 0.5a
6	sBt GX	43.5 ± 0.5a	43.0 ± 1.0a
7	sBt GC	43.5 ± 0.5a	41.5 ± 0.5a
8	sBt S/A	47.5 ± 2.5a	46.0 ± 4.0a
Control	AGUA	45.5 ± 2.5a	45.5 ± 3.0a

n= 10 (Número total de muestras usadas en el experimento) a= Refiérase a la Tabla 3., para la composición del Formulado. Los valores en una columna con la misma letra indican diferencia estadística entre los Tratamientos. Los Tratamientos que comparten letras no tienen diferencia estadística significativa. Prueba de Tukey HSD, P ≤ 0,05.

La Figura 23. muestra el porcentaje de Sobrevivencia de las larvas de *H. cunea* en los arboles tratados con los formulados Con BT, observando la evolución de los nidos de telaraña después de la aspersión, como la sobrevivencia de las larvas desciende con los días, mostrando con esto el desarrollo de los nidos en presencia de los Tratamientos. Por otro lado en el desarrollo de los nidos asperjados con los formulados Sin BT, las larvas de *H. cunea* permanecen sobre los nidos, por el porcentaje de sobrevivencia de las larvas (Figura 24.).

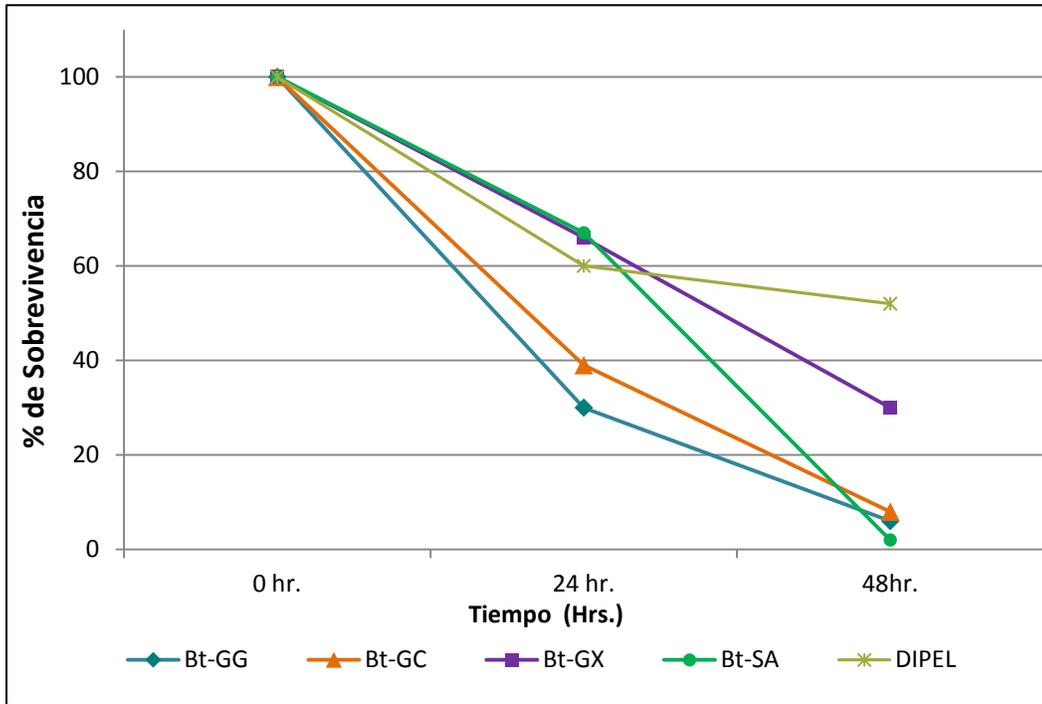


Figura 23. Porcentaje de supervivencia de las larvas sobre los nidos de telaraña de *H. cunea* después de la aspersión con los formulados Con *B. thuringiensis*.

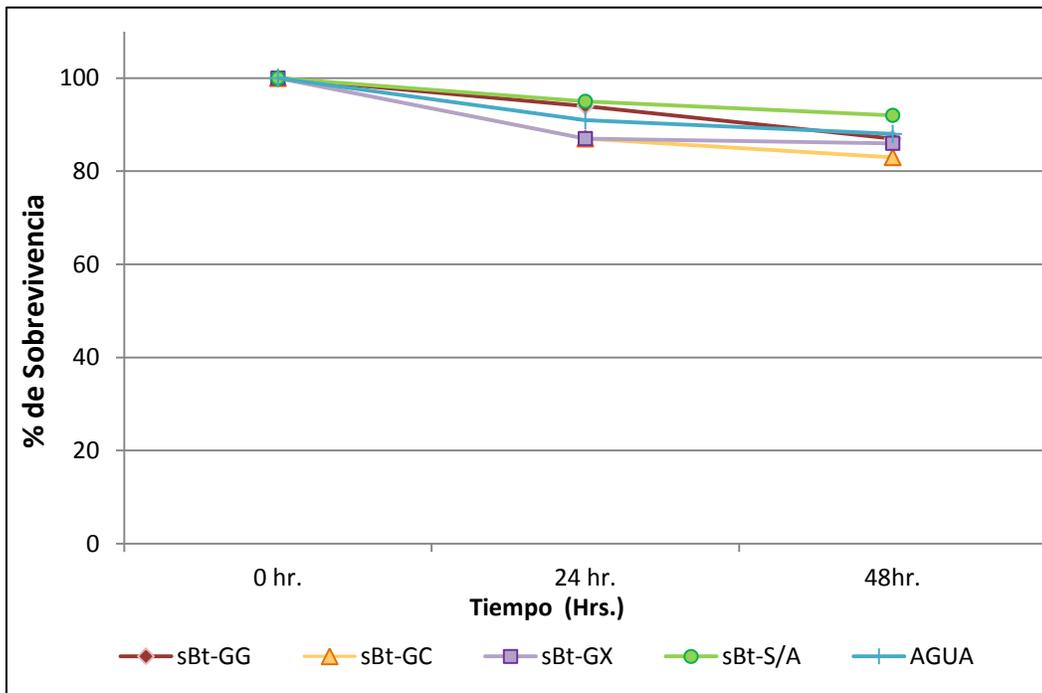


Figura 24. Porcentaje de supervivencia de las larvas sobre los nidos de telaraña de *H. cunea* después de la aspersión con los formulados Sin *B. thuringiensis*.

Hoy en día, la industria comercial del control biológico está bien organizada, ha desarrollado la producción en masa, así como la orientación adecuada para los agricultores, ha colaborado intensamente tanto en el sector público como en el de investigación en el diseño y calidad programas de control, que se aplican durante producción de enemigos naturales, ha participado en la preparación y evaluación del riesgo ambiental de agentes de control biológico. En varias áreas de agricultura el control biológico ha obtenido éxitos considerables y ahora es un elemento confiable y apreciado de los programas de Manejo Integrado de Plagas. Desafortunadamente a pesar de todos estos avances, el control biológico se aplica en una superficie pequeña. La industria de los plaguicidas considera el control biológico como laborioso y de uso restringido, la mayoría de los agricultores tienden convertirse en adictos a los plaguicidas. Recientes desarrollos pueden, sin embargo, conducir a un futuro prometedor para incrementar el control biológico. Además del desarrollo de resistencia siempre constante de las plagas a los pesticidas lo que resulta en la necesidad de métodos alternativos de control, dando prioridad al uso de MIP, esto podría resultar en mejores posibilidades de control biológico (Lenteren 2012).

El uso actual de biopolímeros y de materiales de origen vegetal, permite diseñar matrices microencapsulantes más específicas para la plaga que desea combatirse, éstas reducen las posibilidades de que un insecto no blanco la ingiera, se vuelven muy efectivas para el control de insectos en presencia de un ingrediente activo, además al ser completamente

biodegradables se reduce en gran medida el impacto ambiental adverso (Morales-Ramos *et al.* 2000; Luna-Santillana 2002; Rosas-García *et al.* 2004; Luna-Santillana *et al.* 2011).

En este trabajo se ha considerado que la mejor matriz está compuesta por Capsul®-gelatina y Cenizo, debido a que un mayor número de larvas respondió positivamente a la ingestión. Los niveles de mortalidad observados en bioensayos de laboratorio e invernadero pueden considerarse satisfactorios. El desarrollo de matrices puede contribuir a la elaboración de mejores productos que pueden ser más competitivos en el mercado de los plaguicidas. El desarrollo de formulaciones biológicas para controlar las plagas de insectos es un aspecto fundamental en la preservación del medio ambiente, por lo tanto, debería explorarse esta área específica de formulación contra plagas blanco, donde no represente ninguna amenaza para especies benéficas. La formulación altamente específica diseñada contra *H. cunea* dio resultados exitosos; sin embargo, todavía queda mucha investigación en este campo para obtener más alternativas a controlar las plagas de insectos.

## CONCLUSIONES

- ✓ Las condiciones de temperatura (26-28°C), fotoperiodo (14:10), HR (70-80 %) y dieta nutritiva Shorey (1965), fueron apropiadas para el establecimiento de la cría masiva de *Hyphantria cunea*.
- ✓ *Hyphantria cunea* es susceptible a las toxinas de BT puesto que siete de las cepas probadas mostraron arriba del 60% de mortalidad.
- ✓ La cepa GM-10 de BT presento la menor  $CL_{50}$  contra *Hyphantria cunea*, a una dosis de 0.007 ng/cm<sup>2</sup>, y un menor  $TL_{50}$  (80.83 h) para matar el 50% de la población.
- ✓ La Preferencia Alimenticia de *Hyphantria cunea* fue para el polvo de hoja de Cenizo, ya que presento el mayor numero de larvas sobre el ( $6.14 \pm 0.403$ ).
- ✓ De los formulados microencapsulados con el estimulante de alimentación seleccionado y adherentes, *Hyphantria cunea* prefirió los Tratamientos 8 (sBt S/A) con  $4.78 \pm 0.470$  larvas, y 1 (Bt GG) con  $4.70 \pm 0.474$  larvas atraídas hacia este.
- ✓ *Hyphantria cunea* prefirió, como aditivo a la Goma de Guar, ( $4.31 \pm 0.338$ ) larvas atraídas, sin distinción si esta con BT o sin el.
- ✓ Los tratamientos microencapsulados mantuvieron su actividad insecticida aun después de 15 meses, tanto a temperatura de refrigeración como a temperatura ambiente, sin diferencia significativa.

- ✓ La suspensibilidad de todos los Tratamientos se mantuvo arriba del 90 % de partículas suspendidas por un periodo de 8h y sin diferencia significativa.
- ✓ Todos los Tratamientos, reconstituidos en agua, atravesaron la boquilla de un aspersor con una apertura de 0.5µm a una presión de 5 lb.
- ✓ El Tratamiento 2 (Bt GX) demostró mejor adherencia, con el mayor peso de partículas adheridas al portaobjetos, arriba del aditivo comercial Bionex®.
- ✓ La persistencia de los formulados de sobre las hojas de nogal bajo lluvia simulada y sin ella, fue para el Tratamiento 2 (Bt GX), persiste tanto Con lluvia como Sin lluvia.
- ✓ El control de la plaga en los nidos de *Hyphantria cunea* ya formados en los arboles pequeños, el Tratamiento 1 (Bt GG) fue el mas eficaz, ya que a las 24h ya se observaba el 70% de Mortalidad.
- ✓ El porcentaje de sobrevivencia de las larvas de sobre los nidos de *Hyphantria cunea* después de la aspersion con los Tratamientos con BT, baja hasta menos del 20%.

## PERSPECTIVAS

El uso y aplicación de cepas de BT que presenten capacidades toxicas, es una de las principales ventajas del control biológico, que podría ser explotado para desarrollar nuevas formulaciones insecticidas para el control específico de plagas de importancia económica, además de ser considerado como una alternativa cuando el principal interés es reducir costos y resistencia a insecticidas. Las matrices microencapsulantes desarrolladas a base de productos 100 % biodegradables brindan propiedades ecológicamente benéficas, como la especificidad hacia un insecto plaga, la nula o baja residualidad y la inocuidad para el hombre y los animales, están específicamente diseñadas para una plaga de insectos, siendo atractiva como una alternativa al uso de los plaguicidas químicos, que pueden considerarse como una amenaza contra el ambiente y la salud humana. El uso ingredientes estimulantes de alimentación, asegura que las formulaciones insecticidas sean efectivamente ingeridas por el insecto y como provienen de fuentes naturales, los peligros de contaminación por su liberación al ambiente son mínimos o nulos, pueden ser ampliamente utilizados en el desarrollo de formulaciones. Hay varias funciones de la formulación: la estabilidad del producto, la aplicación efectiva, facilidad de uso y seguridad, y una mayor persistencia después de la aplicación, aunque hay poca investigación en esta área, existen tecnologías disponibles que proporcionan opciones prometedoras.

## BIBLIOGRAFIA

- Angus TA, Luthy P. 1971. Formulations of Microbial insecticides. Chapter. 28 In: Microbial Control of Insects and Mites. Burgues HD. Ed. Academic Press, New York, N.Y. pp. 623-638.
- Aranson AI, Beckman W, Dunn P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol Rev. **50**: 1-24.
- Barbera C. 1976. Pesticidas Agrícolas Capitulo. 1 y 2, 2a. Edición. Ediciones Omega, S.A.: 9 - 46.
- Bartelt RJ, McGuire MR, Black OA. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. **19**: 182-189.
- Behle RW, Támez-Guerra P, McGuire MR. 2003. Field activity and storage stability of *Anagrapha falcipera* nucleopolyhedrovirus (AsMNPV) in spray-dried lignin based formulations. J. Econ. Entomol. **96**: 1066-1075.
- Bernhard K, Utz R. 1993. Production of *Bacillus thuringiensis* Insecticides for Experimental and Commercial Uses en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P. F. *et. al.* (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapur: 255-267.
- Bolin PC, Hutchison WD, Andow DA. 1999. Long-term selection for

resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac endotoxin in a Minnesota population of the European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). J. Econ. Entomol. **92**:1021-1030.

Botanical, 1999. Características del nogal Disponible en:

<http://www.botanical-online.com/nueces.htm> (Acceso: Febrero 2013)

Boyette CD, Quimby Jr. PC, Birdsall CJL, Connick Jr. WJ, Daigle DJ, Jackson MA, Egley GH, Abbas HK. 1996. Adjuvants, Formulations and Spraying for Improvement of Mycoherbicides. Weed Technology. **10**: 637 - 644.

Bradley D, Harkey MA, Kim MK, Biever KD, Bauer LS. 1995. The insecticidal Cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis* ssp. *thuringiensis* has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. J. Invertebr. Pathol. **65**:162-173.

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

Camarena GDM y Sanjuán ALI 2005. Comercialización de la Nuez Pecán en el Mercado Europeo. *Revista Mexicana de Agronegocios*, IX (17). Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=14101706> (Acceso: Febrero de 2014).

Campos J. S., L. Vázquez, E. Olivares, L. M. Treviño, O. Santos, C. Lemus, H. Aguilar y J. A. Leyva. 2005. Diagnóstico del cultivo de nogal. En los Municipios de Aramberri, Bustamante, Rayones, Villaldama y Zaragoza, Nuevo León. Documento de Circulación Interna de la Dirección Agrícola de la Delegación Federal de la SAGARPA en el Estado de Nuevo León. (Disponible en:

[http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/estudios\\_e\\_investigaciones/AGRICULTURA/nogal.pdf](http://www.agronuevoleon.gob.mx/oeidrus/estudios_e_investigaciones/AGRICULTURA/nogal.pdf) (Acceso: Enero 2014)

Cerón JA. 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. Caballero P, Ferré J. [ed], M .V. Phytoma-España, S.L. España.

Connick WJ, Lewis JA, Quimby PC. 1989. Formulation of biocontrol agents for use in plant pathology. UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, New Series, Vol. 112.

Couch TL, Ignoffo CM. 1981. Formulation of Insect Pathogens. Chapter 34. *En: Microbial Control of Pest and Plant Diseases*. Burges HD. (Ed.) Academic Press London. 622 - 634.

Couch TL. 1978. Formulations of Microbial Insecticides. Conventional Formulations. Misc. Publ. Entomol. Soco Am. **5**: 3-10.

Couch TL, Ross DA. 1980. Production and utilization of *Bacillus thuringiensis*. *Biotech. and Bioing.* **22**: 1297-1304.

De Luna Santillana EJ. 2002. Desarrollo de Formulaciones de *Bacillus*

*thuringiensis* a partir de Gelatina y/o Pectina y evaluación toxica contra el Barrenador del tallo de la caña de Azúcar “*Diatraea saccharalis fabricius*” Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

De Luna-Santillana EJ, Rodríguez-Pérez MA, Ali-Mahmoud AM, Morales-Ramos LH, Gopal H, Arévalo-Niño K. 2011. Evaluation of potential microencapsulated agents for oral entomopathogens with phagostimulant activity against *Spodoptera exigua* (Hüber). Southwest. Entomol. 4: 433-442.

Denolf P, Jansens S, Peferoen M, Degheele D, Van Rie J. 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.

Dethier VG, Browne LB, Smith CN. 1960. The designation of chemicals in terms of the responses they elicit from insects J. Econ. Entomol. 53: 134-136.

Douce GK. 1997. Fall Webworm *Hyphantria cunea* (Drury). Disponible en: [www.bugwood.org/factsheets/webworm.html](http://www.bugwood.org/factsheets/webworm.html) (Acceso: Diciembre 2013)

Dulmage HT. 1973. *Bacillus thuringiensis* U.S. Assay Standard. Report on the Adoption of a Primary U.S. Reference Standard for Assay Formulations Containing the d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. Bull. Entomol. Am. 4: 200-202.

- Dulmage HT. 1975. The Standardization of Formulation of the  $\delta$ -endotoxins Produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **25**: 279-281.
- Dulmage HT, Martinez E. 1973. The Effects of Continuous Exposure to Low Concentration of the  $\delta$ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* on the Development of the Tobacco Budworm *Heliothis virescens*. *J. Invertebr. Pathol.* **22**: 14-22.
- Dulmage HT, Aizawa K. 1980. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in Nature. Published by U.S.D.A., Brownsville, Texas, U.S.A. **4**: 209-236.
- Dulmage HT, Orlin M. 1977. A proposed standardized bioassay for formulation of *Bacillus thuringiensis* based on the international unit. *J. Invertebr. Pathol.* **18**: 240-245.
- Dulmage HT, Correa JA, Martínez AJ. 1970. Coprecipitation with lactose as a Means of recovering the Spore-Cristal Complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* **15**: 15-20.
- Dulmage HT, Boening OP, Rehnborgand CS, Hunsen GD. 1971. A Proposed Standardized Bioassay for Formulations of *Bacillus thuringiensis* Based on the International Unit. *J. of Invertebr. Pathol.* **18**: 240-245.
- Dunkle HL, Shasha BS. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. *Environ. Entomol* **17**: 120-126.
- Estada U, Ferré J. 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.

Fanar RR, Ridgway RL. 1994. Comparative studies of the effects of nutrient-based phagostimulants on six lepidopterous insect pests. *J. Econ Entomol.* **87**:44-52.

Galán-Wong LJ, Pereyra-Alfárez B, Luna-Olvera HA. Bacterias entomopatógenas. *Biotecnología financiera aplicada a bioplaguicidas*. In: García-Gutiérrez C, Medrano-Roldán H., Eds. México 2006; pp. 43-63.

Gasca H. 2006. *Insectarium virtual revista electrónica*. Disponible en: <http://www.insectariumvirtual.com/reportajes/conservacion/conservacion.htm> (Acceso: Diciembre 2006)

Gillespie RL, McGuire MR, Shasha BS. 1994. Palatability of flour granular formulations to European corn borer larvae (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **87**: 452-457.

Glare T, Caradus J, Gelernter W, Jackson T, Keyhani N, Köhl J, Marrone P, Morin L, Stewart A. 2012. Have biopesticides come of age?. *Trends in Biotechnology*, **30**: 250-258.

Gomi T, Hirochika M, Nagasaka M, Hagihara H, Fukuda T. 2005. Effects of diet on life-history traits in a trivoltine Kobe population of *Hyphantria cunea* (Drury) (Lepidoptera: Arctiidae). *Appl. Entomol. Zool.* **3**: 475-482

González AM, Salcedo SM, Vargas VR, Pérez N, Bonilla N. 2010. Capítulo 9

Importancia Económica y Social *En: Cultivo del Nogal Pecanero Carya illinoensis* (Wangenheim) K. Koch en Nuevo León. UANL., México pp. 147-152

González-Cabrera J, Mollá O, Montón H, Urbaneja A. 2011. Efficacy of *Bacillus thuringiensis* (Berliner) in controlling the tomato borer, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) *Bio Control* **56**:71-80

Goto M, Ito Y, Sato Y, Sasaki K, Goto N. 2001. Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan. *Journal of Physiology* **47**:1181-1187.

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

Griego VM, Spence KD. 1978. Inactivation of *Bacillus thuringiensis* spores by ultraviolet and visible lighth. *Appl. Environ. Microbiol.* **35**: 906-910.

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

Harris J, Dent D. 2000. Priorities in biopesticide research and development in developing countries. CABI Publishing, pp. 1-35.

Harrns RG, Martínez DR, Griego VM. 1986. Isolation and Characterization of Coproporphyrin produced by four subspecies of *Bacillus*

*thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. **51**: 481-486.

Heimpel AM, Angus TA. 1959. The Site of Action of Crystalliferous Bacteria in Lepidoptera Larvae. J. Insec. Pathol. **1**: 152-170.

Heimpel AM, Angus TA. 1963. Diseases Caused by Creating Spore-Forming Bacteria, In: Steinhaus E.A. (ed.) Insect Pathology, and Advances Treatise, New York. **2**: 21-73.

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

Höfte H, Van Rie J, Jansens S, Van Houtven A, Vanderbruggen H, Vaeck M. 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.

Hough-Goldstein J, Tisler AM, Zehnder GW, Uyeda KA. 1991. Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysornelidae) consumption of foliage treated with *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* and various feeding stimulants. J. Econ. Entomol. **84**: 87-93.

Ignoffo CM, Hostetter DL, Smith DB. 1976. Gustatory stimulant, sunlight protectant, evaporation retardant: Three characteristics of a microbial insecticidal adjuvant. J. Econ Entomol. **69**: 207- 210.

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

- Ignoffo CM, Garda C, Saathoff G. 1997. Sunlight stability and rain-fastness of formulations of *Baculovirus heliothis*. *Environ Entomol.* **26**: 1470-1474.
- Ignoffo CM, Hostetter DL, Sikorowski PP, Sutter G, Brooks WM. 1977. Inactivation of Representatives Species of Entomopathogenic Viruses, a Bacterium, Fungus and Protozoan by an Ultraviolet Light Source. *Environ. Entomol.* **6**: 411-415.
- Inagaki S, Miyasono M, Ishiguro T, Takeda R, Hayashi Y. 1992. Proteolytic processing of  $\delta$ -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.
- Jaques RP, Fox CJS. 1960. The influence of Stickers on the effectiveness of Sprays of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and *Bacillus entomocidus* var. *entomocidus*. *J. Insect Pathol.* **2**: 17-23.
- Jaramillo PJ. 2007. Evaluación de cinco productos naturales y un producto comercial Coax® como fagoestimulante para el gusano de la bolsa de nogal *Hyphantria cunea* Drury (Lepidóptera: Arctiidae). Tesis de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.
- Johnson DR. 1982. Suppression of *Heliothis* spp. on cotton by using *Bacillus thuringiensis*, *Baculovirus heliothis*, and two feeding adjuvants. *J. Econ Entomol.* **75**: 207-2

Kati H, Sezen K, Nalcacioglu R, Demirbag Z. 2007. A Highly Pathogenic Strain of *Bacillus thuringiensis* serovar kurstaki in Lepidopteran Pests. *The Journal of Microbiology*. 45 (6) p. 553-557.

Keith DG. 1997. Fall Webworm *Hyphantria cunea* (Drury) Te bugwood Network. (Disponible en: <http://www.bugwood.org/factsheets/webworm.html> Accesado el: Febrero 2014.

Klass C. 2010. Fall Webworm *Hyphantria cunea*. Insect Diagnostic Laboratory. Cornell University, New York (Disponible en: <http://dspace.library.cornell.edu/bitstream/1813/14326/2/Fall%20Webworm.pdf> (Acceso: Diciembre 2013)

Klowden MJ, Held GA, Bulla LA. 1983. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *isralensis* to Adult. *Aedes aegypti* Mosquitoes. *App. Environ. Microbiol.* 2: 312-315.

Koziel MG, Carozzi NB, Currier TC, Warren GW, Evola SV. 1993. The insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*: Past, present and future uses. *Biotechnol. Gen. Engineer. Review.* 11:171-228.

Lambert B, Peferoen M. 1992. Insecticidal promise of *Bacillus thuringiensis*. *BioScience.* 42: 112-122.

Lambert B, Buysse L, Decock C, Jansens S, Piens C, Saey B, Seurinck J, Van Audenhove K, Van Rie J, Van Vliet A, Peferoen M. 1995. A *Bacillus thuringiensis* Insecticidal crystal protein with a high activity against members of the family Noctuidae. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 80-86.

- Lee MK, Rajamohan F, Gould F, Dean DE. 1995. Resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1A  $\delta$ -endotoxins in a laboratory-selected *Heliothis virescens* strain is related to receptor alteration Appl. Environ Microbiol. **61**:3836-3842.
- Lenteren JC. 2012. The state of commercial augmentative biological control: plenty of natural enemies, but a frustrating lack of uptake. BioControl **57**:1–20
- Leong KLH, Cano RJ, Kubisnki AM. 1980. Factors affecting *Bacillus thuringiensis* total field persistence. Environ. Entomol 9:593-599.
- Lewis FS. 1983. Formulation and Application of Microbial Insecticides for Forest Insect Pest Management: Problems and Considerations. Pesticide Formulations: Third Symposium.
- Li YP, Goto M, Ito Y, Sato Y, Sasaki K, Goto N. 2001. Physiology of diapause and cold hardiness in the overwintering pupae of the fall webworm *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae) in Japan. J. Insect. Physiol. 47:1181-1187.
- Liu YB, Tabashmk BE, Johnson MW. 1995. Larval age affects resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **88**: 788-792.
- Lu H, Rajamohan F, Dean DH. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin Cry1Aa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. J. Bacteriol. **176**:5554-5559.

- Lüthy P. 1980. Insecticidal toxins of *Bacillus thuringiensis*. Federation of European Microbiological Societies. (FEEMS) Microbiol. Lett. **8**: 1-7.
- Lüthy P, Ebersold HR. 1981. The Entomocidal Toxins of *Bacillus thuringiensis*. Pharmac Ther Pergamon Press. Great Britain. **13**: 257-283.
- Margalit J, Markus A, Pelah Z. 1984. Effect of Encapsulation on the Persistence of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*, Serotype H-14. Appl. Microbiol. Biotechnol. **19**: 382-383.
- Marrone P. 2011, Biopesticides—legitimate products for integration into IPM and certified organic production. Disponible en:  
<http://www.organicfertilizerassociation.org/Marrone-Biopesticides.pdf>  
(Acceso: septiembre de 2011)
- Martínez LA. 2009. Dimensionamiento y simulación de un secador por aspersión de nivel piloto. Tesis de Maestro en Ciencias en Bioprocesos. Secretaria de Investigación y Posgrado. IPN., México, D.F. Mex.
- McGuire MR, Shasha BS, Lewis LC, Nelsen TC. 1994. Residual activity of granular starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*. J. Econ Entomol **87**: 631-637.
- McGuire MR, Shasha B S, Lewis LC, Bartelt RJ, Kinney K. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). J. Econ. Entomol. **83**: 2207-2210.
- McGuire MR, Shasha BS. 1992. Adherent starch granules for encapsulation

of insect control agents. *J. Econ. Entomol.* **85**: 1425-1433.

McGuire MR, Shashay BS. 1990. Sprayable self-encapsulating starch formulations for *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol* **83**: 1813-1817.

McGuire MR, Shasha BS. 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 MR, Shasha BS, Eastman CE, Oloumi-Sadeghi H. 1996. Starch- and four-based sprayable formulations: effect on rainfastness and solar stability of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **89**: 863-869.

McGuire MR, Shasha BS, Lewis LC, Bartelt RJ, Kinney K. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* **83**: 2207-2210.

McMillian WW, Young JR, Wiseman BR, Sparks AN. 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.

Medrano-Roldan H, Solís SA, Casillas ACL, García GC, Granados CUH, Rodríguez-Padilla C, Galán-Wong LJ. 1989. Efecto de las condiciones y tipo de secado sobre las características toxicológicas de bioinsecticidas. Res. III Congr. Nal. de Biotecnol. y Bioing. Monterrey, N.L.

- Moffat AS. 1991. Research on biological pest control moves ahead. *Research News Sci.* **252**: 211-212.
- Morales-Ramos LH. 1993. Formulación de bioinsecticidas. Capitulo No 10. *En "Biotecnología para la Producción de Bioinsecticidas Microbianos Centrada en *Bacillus thuringiensis*". (Galán-Wong L.J. Ed.) UNAM, México, D.F.: pp. 85-90.*
- Morales-Ramos LH. 1996. Formulación de bioinsecticidas. *En "Avances recientes en la Biotecnología en *Bacillus thuringiensis*". (Galán-Wong L.J. Rodríguez-Padilla y Luna Olvera Ed.) UNAM, México, D.F.: pp. 157-177.*
- Morales-Ramos LH, McGuire MR, Galán-Wong LJ. 1998. Utilization of several biopolymers for granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *J. Econ. Entomol.* **91**: 1109-1113.
- Morales-Ramos LH, McGuire MR, Galán-Wong LJ, Castro-Franco R. 2000. Evaluation of pectin, gelatin and starch granular formulations of *Bacillus thuringiensis*. *Southwest. Entomol.* **25**: 59-67.
- Norris JR. 1987. Microbial Control of Pest Insects. *En Alan T. Bull and Pauline M. Meadow (Eds.) Companion to Microbiology Longman. pp. 459-479.*
- Ogiwara K, Indrasith LS, Asano S, Hori H. 1992. Processing of  $\delta$ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 and HD-73 by gut juices of various insect larvae. *J. Invertebr. Pathol.* **60**: 121-126.
- Okos MR, Narsimham G. 1990. Establishing the parameters for a Spray

dryer; Chem. Eng.; Cit. Food dehydratation: *En Handbook of food Engineering*; New York, E.U.A.; pp 108- 112

Palacios CLL, 1993. Aspectos de la fermentación de *Bacillus thuringiensis* var. aizawai a nivel de Planta Semipiloto. Tesis de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Pendleton IR. 1969. Insecticides of Crystal Forming Bacteria. *Process Biochemistry*. pp. 29-32.

Pozsgay M, Fast P, Kaplan H, Carey PR. 1987. The effect of Sunlighth on the Protein Crystal from *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* HD-1 and NRD12: a Raman Spectroscopic Study. *J. Invertebr. Pathol.* **50**: 246-253.

Prasad SSSV y Shethna YI. 1976. Biochemistry and Biological Activities of the Proteinaceous Crystal of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Scientific Ind. res.* **35**: 626-632.

Pristavko WP. 1965. On the use of *Bacillus thuringiensis* insecticide combinations to control insect pests. *Resumen VI-5*. pp 212-214.

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

Rajamohan F, Alcantara E, Lee MK, Chen XJ, Curtiss A, Dean DH. 1995. Single amino acid changes in domain II of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab  $\delta$ -endotoxin affect irreversible binding to *Manduca sexta* midgut membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **177**: 2276-2282.

- Rhodes OJ, Powell KA, Macqueen MP, Graves MP. 1990. Controlled Delivery of Biological Control Agents. Capitulo 11. *En* "Controlled Delivery of Crop-Protection Agents". (Wilkins R.M. Ed.) Taylor & Francis. London. N.Y. Philadelphia. pp. 215-231.
- Rhodes D. 1993. Formulation of biological control agents. *En* Exploitation of Microorganisms. D. G. Jones [ed] Chapman and Hall London.
- Richards JW. 1961. Studies in aeration and agitation. Progr, in Ind. Microbiol. **3**: 141-155.
- Ríos-Díez JD, Siegfried B, y Saldamando-Benjumea CI. 2012. Susceptibility of *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) Strains from Central Colombia to Cry1Ab and Cry1Ac Entotoxins of *Bacillus thuringiensis*. Southwest Entomol 3:281-293.
- Roh JY, Choi JY, Li MS, Jin BR, Je YH. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol. **17**: 547–559
- Rombach MC, Aguda RM, Picard L, Roberts DW. 1989. Arrested Feeding of the Asiatic Rice Borer (Lepidoptera: Pyralidae) by *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **82**: 416-419.
- Rosas-García NM. 2006. Laboratory and field tests of spray-dried and granular formulations of a *Bacillus thuringiensis* strain with insecticidal activity against the sugarcane borer. Pest Manag. Sci. **62**: 855-861.

- Rosas-García NM. 2009. Biopesticide production from *Bacillus thuringiensis*: an environmentally friendly alternative. *Rec. Pat. Biotech.* **3**: 28-36
- Rosas-García NM, de Luna-Santillana EJ. 2006. Diseño de una matriz microencapsulante a partir de compuestos biodegradables para la elaboración de un bioinsecticida. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **3**: 135-142
- Rosas-García NM, Villegas-Mendoza JM, Torres-Ortega JA. 2009. Design of a *Bacillus thuringiensis*-based formulation that increases feeding preference on *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) Larvae. *Biol. Microbial. Control.* **102**: 58-63.
- Rosas-García NM, Arévalo-Niño K, Galán-Wong LJ, Morales-Ramos LH. 2004. Evaluation of feeding stimulants combined with polymers to develop formulations against *Diatraea saccharalis* (F). *Southwest. Entomol.* **29**: 153-158.
- Rossiter M, Yendol WG, Dubois NR. 1990. Resistance of *Bacillus thuringiensis* in gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae): Genetic and environmental causes. *J. Econ. Entomol.* **83**: 2211-22218.
- Ruiz Gonzalez E. 1998. Modificación y evaluación de una dieta artificial Shorey para la cria de *Trichoplusia ni* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis para el título de QBP. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.
- SAGARPA 2011. Exportan nuez de Sonora a China. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. Comunicado de Prensa Num.028/11 Disponible en:

<http://www.sagarpa.gob.mx/saladeprensa/boletines2/paginas/2011B028.aspx> (Acceso: Enero 2012)

SAGARPA 2011. Nuez Encarcelada, *Caraya illinoensis*. Disponible en:[http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_content&view=article&id=224&Itemid=107](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=224&Itemid=107) (Acceso: Junio 2011).

SAGARPA 2012 Plan rector del Sistema Producto Nuez. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación de México. Disponible en:  
[http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP\\_CNSP\\_NOGAL/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR\\_CNSP\\_NOGAL\\_2012.pdf](http://dev.pue.itesm.mx/sagarpa/nacionales/EXP_CNSP_NOGAL/PLAN%20RECTOR%20QUE%20CONTIENE%20PROGRAMA%20DE%20TRABAJO%202012/PR_CNSP_NOGAL_2012.pdf)  
(Acceso: Abril 2014)

Salama HS, Morris ON. 1993. The use of *Bacillus thuringiensis* in Developing Countries en "*Bacillus thuringiensis* An Environmental Biopesticide: Theory and Practice". Entwistle P.F. et. al. (eds). John Wiley & Sons. Chichester. N.Y. Brisbane. Toronto. Singapore. pp. 237-253.

Sanchez MRI. 1996. Producción y microcapsulación de un bioinsecticida a partir de *Bacillus thuringiensis* para combatir insectos plaga. Tesis de Maestro en Ciencias con especialidad en Ingeniería de Alimentos; I.T.D. División de Estudios de Postgrado e Investigación, I. T. D. Durango, Dgo., México.

Santiago-Alvarez C, Quesada-Moraga E. 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.

Sauka DH, Benintende GB. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Arg. Micro. 40: 124-140

Saucedo Valadez S. 2003. Modificación y evaluación de una dieta artificial Shorey para la cria de *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis de Químico Bacteriólogo Parasitólogo. Fac. Ciencias Biológicas. UANL. Monterrey N.L. Mex.

Sawicka EM, Couch TL. 1983. Formulations of entomopathogens, pesticide formulations and application systems: Third Symposium, ASTM STP. (T.M. Kaneko and N.B. Akesson, Eds.). American Society for Testing and Materials, Philadelphia.: 5-11.

Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lerechis D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR y Dean DH. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**: 775-806.

Shahidi F, Han X. 1993. Encapsulation of Food Ingredients. Food Science and Nutrition. **33**: 501-546.

Shapiro M. 1989. Congo red as an ultraviolet protectant for the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. J. Econ. Entomol. **82**: 548-550.

Shetlar DJ. 1991. Fall Webworm. (Disponible en:

<http://ohioline.osu.edu/hyg-fact/2000/2026.html> (Acceso: Enero 2010)

Shetlar DJ. 2000. Fall Webworm Management, HYG-2026-95. Ohio State Univ. Ext. Factsheet - Entomology. Ohio State Univ. Columbus, OH. (Disponible en:  
<http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/2000/2026.html>  
(Acceso: Febrero de 2014).

Shetlar DJ. 2000. Fall Webworm Management, HYG-2026-95. Ohio State Univ. Ext. Factsheet - Entomology. Ohio State Univ. Columbus, OH. (Disponible en:  
<http://www.ag.ohio-state.edu/~ohioline/hyg-fact/2000/2026.html>  
(Acceso: Febrero 2014)

Smirnoff WA, Hutchison PM. 1965. Bacteriostatic and Bacteriocidal. Effects of Extracts of Foliage from Various Plants Species on *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner. J. Invertebr. Pathol. **7**: 273 - 280.

Stanbury PF, Writaker A. 1984. Media for Industrial Fermentations. Chapter 4. In Principles of Fermentation Technology. Pergamon Press., England, New York. 74-90.

Tabashnik BE, Finson N, Johnson MW, Heckel DG. 1994. Cross-resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1F in the diamondback moth (*Plutella xilostella*). Appl. Environ. Microbiol. **60**: 4627-4629.

Takeda M. 2005 Differentiation in life cycle of sympatric populations of two forms of *Hyphantria* moth in central Missouri *Entomological Science* **8**: 211-218

- Támez-Guerra P, García-Gutiérrez C, Medrano-Roldán H, Galán-Wong LJ, Sandoval-Coronado CF. 1999. Spray-dried microencapsulated *Bacillus thuringiensis* formulations for the control of *Epilachna varivestis* Mulsant. Southwest. Entomol. **24**: 37-48
- Támez-Guerra P, Iracheta MM, Pereyra-Alfárez B, Galán-Wong LJ, Gómez-Flores R, Tamez-Guerra RS, Rodríguez-Padilla C. 2004. Characterization of Mexican *Bacillus thuringiensis* strains toxic for lepidopteran and coleopteran larvae. J. of Invertebr. Pathol. **86**: 7-18
- Támez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Hamm JJ, Sumner HR, Shasha BS. 2000. Sunlight persistence and rainfastness of spray-dried formulations of báculo virus isolated from *Anagrapha falcifera* (Lepidoptera: Noctuidae). J. Econ Entomol. **93**:210-218. (a)
- Támez-Guerra P, McGuire MR, Medrano-Roldán H, Galán-Wong LJ, Shasha BS, Vega FE. 1996. Sprayable granule formulations for *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. **89**: 1424-1430.
- Támez-Guerra P, McGuire MR, Behle RW, Shasha BS, Galán-Wong LJ. 2000. Assessment of microencapsulated formulations for improved residual activity of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ Entomol. **93**:219-225. (b).
- Támez-Guerra P, Castro-Franco R, Medrano-Roldán H, McGuire MR, Galán-Wong LJ, Luna-Olvera HA. 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.

- Tojo A, Aizawa K. 1983. Dissolution and Degradation of *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin by Gut Juice Protease of the Silkworm *Bombix mori*. *App. Environ. Microbiol.* **2**: 576-580.
- Van Rie J, Jansens S, Höfte H, Degheele D, Van Mellaert H. 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 RC, Hutchison WD, Andow DA. 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.
- Wilkins RM. 1990. Biodegradable Polymer Methods Chapter 8. *En Controlled Delivery of Crop-Protection Agents*. Wilkins RM. (Ed.) Taylor & Francis London. New York. Philadelphia. pp. 149 - 165.
- Worth RA. 1994. University of Florida Book of Insect Records Chapter 2 Greatest Host Range. pp 1-4.
- Yaman M, Nalçacıoğlu R, Demitbağ, Z. 2002. Studies on bacterial flora the population of the fall webworm, *Hypantria cunea* Drury. (Lep., Arctidae). *J. Appl. Ent.* **126**: 470-474.
- Yáñez Fernández J, Salazar Montoya JA, Chaires Martínez L, Jiménez Hernández J, Márquez Robles M, Ramos Ramírez EG. 2005. Aplicaciones Biotecnológicas de la Microencapsulación. *Mundo Alimentario; Tecnología*. pp 24-30.

Yamanaka T, Tatsuki S, Shimada M. 2001. Flight Characteristics and Dispersal Patterns of Fall Webworm (Lepidoptera: Arctiidae) Males. *Environ. Entomol.* **30**: 1150-1157.

Zibae I, Bandani AR, Sendi JJ, Talaei-Hassanloei R, Kouchaki B. 2010. Effects of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* and Medicinal Plants on *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae), *Invertebr. Surv. J.* **7**: 251-261.

Zomer E, Spielman A, Perrone JB. 1989. Encapsulated bacterium containing insect toxin with polymer coating permeable to insect digestive enzymes but preventing environmental degradation. Harvard Collage. Patent # W08907447.

## RESUMEN BIBLIOGRAFICO

Candidato para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN BIOTECNOLOGIA

Tesis: DESARROLLO Y EVALUACIÓN DE FORMULADOS ASPERJABLES DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CONTROL DEL GUSANO DE BOLSA DEL NOGAL *Hyphantria cunea* (DRURY)

Campo de estudio: Biotecnología

Datos Personales: Nacido en Monterrey, N. L. el 7 de Abril de 1961, hija de Rubén Palacios Arriaga y Julia Cortez Rangel

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en Noviembre de 1984, y Maestría en Ciencias con Especialidad en Microbiología en Marzo de 1993.

Experiencia Profesional: Personal de Investigación de T. C. en FCB, UANL.



17Jun14

Estimada Dra. Morales Ramos: su manuscrito titulado 'Selección de cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* Toxicas para larvas de *Hyphantria cunea* Drury (Lepidoptera: Arctiidae), SWE#2421, ha sido recibido para revisión de pares en la revista *Southwestern Entomologist*. Dentro de pocas semanas le informaré sobre los comentarios que revisores anónimos le harán a su trabajo.

Sin más por el momento reciba un afectuosos saludo y le agradecemos su interés de publicar su interesante trabajo en nuestra revista.

Atentamente,

*Carlos A. Blanco*

Carlos A. Blanco, Editor asociado

[Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov](mailto:Carlos.a.blanco@aphis.usda.gov) / [carlos.blanco1206@gmail.com](mailto:carlos.blanco1206@gmail.com) /

[cblancom@unm.edu](mailto:cblancom@unm.edu)

Cc. Dr. Bonnie Pendleton, Editor-in-Chief