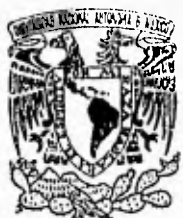


109  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

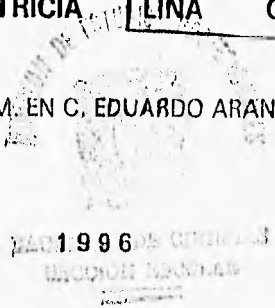
FACULTAD DE CIENCIAS

Evaluación del efecto tóxico de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* sobre estadios inmaduros del gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith) y del gusano soldado (*Spodoptera exigua* Hubner) en condiciones de laboratorio.

**TESIS PROFESIONAL**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G O**  
P R E S E N T A  
**LAURA PATRICIA LINA GARCIA**



DIRECTOR DE TESIS: M. EN C. EDUARDO ARANDA ESCOBAR



**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: Evaluación del efecto tóxico de cepas nativas de Bacillus thuringiensis sobre estadios inmaduros del gusano cogollero del maíz (Spodoptera frugiperda Smith) y del gusano soldado del algodonero (Spodoptera exigua Hübner) en condiciones de laboratorio.

realizado por Laura Patricia Lina García

con número de cuenta 7916531-2 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	M. en C. Eduardo Aranda Escobar
Propietario	M. en C. Raúl García Acosta
Propietario	Biol. María Cristina Perez Reyes
Suplente	M. en C. Victor Machain Castell de Oro
Suplente	M. en C. Rebeca Martínez Flores

REARANDA

REYES

REBECA MARTINEZ FLORES

FACULTAD DE CIENCIAS

Consejo Departamental de Biología

COORDINADOR DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DE BIOLÓGICA

La presente investigación se desarrolló en el laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo de la Parra del Instituto de Biotecnología de la UNAM (Campus Cuernavaca) y en el laboratorio del M.C. Eduardo Aranda Escobar del Centro de Investigación en Biotecnología de la UAEM, Cuernavaca, Morelos.

A mi mamá:  
Gilda García Andrade.  
Con todo mi amor y respeto  
porque todo lo que soy y puedo  
aspirar a ser es producto de su  
ejemplo, apoyo y amor.

A mi hija:  
Renata Ponce Lina.  
Una lucecita importante  
en mi vida, deseando supere  
y mejore en demasia el ejemplo  
que pueda darle.

A mis hermanas:  
Gilda y Claudia.  
Por la vida que nos  
tocó compartir y  
por su cariño.

A tía Maga por su apoyo y consejos.  
A Rafa por su ayuda y amistad.  
A Feliciano por su tiempo.

Y toda mi familia porque he  
recibido cariño.

## AGRADECIMIENTOS

Mi total y sincero agradecimiento al M.C. Eduardo Aranda Escobar por su enseñanza, guía, amistad y gran paciencia, así como mi admiración por ser un verdadero maestro y una persona excepcional.

A la Dra. Alejandra Bravo de la Parra y al Dr. Rodolfo Quintero por haberme dado la oportunidad de trabajar en su grupo.

Mi particular agradecimiento al personal del Laboratorio de Parasitología Vegetal del CIB-UAEM y muy en especial al Biol. Armando Burgos Solorio por su apoyo incondicional para proporcionarme un lugar de trabajo y el material requerido, así como por su compañerismo.

A la QFB Myriam Ortiz por su colaboración en la obtención de las cepas utilizadas, así como al Dr. Mihm y su grupo de trabajo del CIMMYT por proporcionar el pie de cría de las especies de lepidópteros utilizados en éste trabajo.

Agradezco a la Dra. Dorotea Barnes de Castro, a la Dirección de Intercambio Académico de la U.N.A.M. y a la Dirección de Becas de la U.A.E.M. por el invaluable apoyo recibido.

A la señora Vicky, secretaria del CIB-UAEM, por su ayuda y asesoría en la elaboración de tablas, así como a Adriana Rodríguez por su ayuda en la impresión del trabajo.

A mi compañera y amiga de tantos años Sara Solís Valdez por los entrañables momentos y por su ejemplo de superación. Así como a Francis, Elia, Elvira, José Luis y José por los gratos ratos de esparcimiento esperando que pronto estén en la misma situación.

A los integrantes del jurado por su participación en la revisión de éste trabajo.

A todas aquellas personas que participaron en mi formación como maestros o como condiscipulos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México que prodigamente me albergó desde los primeros años de mi vida y de la cual me siento satisfecha de pertenecer.

## INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRODUCCION	3
OBJETIVOS	5
ANTECEDENTES	6
Insecticidas microbianos	6
Un patógeno prometedor: <i>Bacillus thuringiensis</i>	7
Características de <i>B. thuringiensis</i>	8
Inicios como bioinsecticida	8
Toxinas producidas por <i>B. thuringiensis</i>	13
Características del cristal	14
Formación del cristal	16
Modo de acción	17
Insectos "blanco": especificidad	19
Antecedentes de su uso en México	22
Ventajas y desventajas	23
MATERIALES Y METODOS	26
Organismos para las pruebas	26
Obtención de cepas de <i>B. thuringiensis</i>	27
Ensayos de mortalidad	27
Pruebas de desarrollo de resistencia y efecto en la pupación	28
Resistencia	29
Pupación	29
RESULTADOS	
Bioensayos con <i>Spodoptera frugiperda</i> y <i>Spodoptera exigua</i>	31



Pruebas de desarrollo de resistencia y efecto en la pupación en <i>S. thuringiensis</i>	37
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS	41
APENDICES	43
I. Tablas de resultados	43
II. Metodología para Muestras	50
III. Método de obtención de cepas nativas de <i>B. thuringiensis</i> a partir de suelas	51
LITERATURA CITADA	52

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1.	Algunos de los insectos susceptibles a las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i>	9
Tabla 2.	Productos comerciales a base de la delta-endotoxina de <i>Bacillus thuringiensis</i>	11
Tabla 3.	Efecto de la mezcla esporas-cristales de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en la sobrevivencia de larvas de primer estadio de <i>S. frugiperda</i> . La concentración empleada fué de 200 ng/cm <sup>2</sup> .	43
Tabla 4.	Prueba a posteriori del análisis de varianza señalado en la tabla 3.	44
Tabla 5.	Efecto de la mezcla esporas-cristales de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en la sobrevivencia de larvas de primer estadio de <i>S. frugiperda</i> . La concentración empleada fué de 2000 ng/cm <sup>2</sup> .	45
Tabla 6.	Prueba a posteriori del análisis de varianza señalado en la tabla 4.	46
Tabla 7.	Efecto de la mezcla esporas-cristales de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en la sobrevivencia de larvas de primer estadio de <i>S. frugiperda</i>	47
Tabla 8.	Concentración Letal media (CL <sub>50</sub> ) de las cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> probadas contra larvas de primer estadio de <i>S. frugiperda</i> . La CL <sub>50</sub> está expresada en ng/cm <sup>2</sup> de superficie de dieta	48
Tabla 9.	Sobrevivencia de larvas de primer estadio de <i>Spodoptera exigua</i> alimentadas con cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> mezcla esporas-cristales a una concentración de 100 ng/cm <sup>2</sup>	48
Tabla 10.	Efecto de la mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137 de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el desarrollo de <i>S. frugiperda</i> al evaluar el posible desarrollo de resistencia	49
Tabla 11.	Efecto de concentraciones subletales de mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137 de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el desarrollo larvario y pupación de <i>S. frugiperda</i>	49

Figura 1. Diferentes estados de desarrollo de <i>Bacillus thuringiensis</i>	15
Figura 2. Esporulación de <i>Bacillus thuringiensis</i> y formación del cristal proteico	18
Figura 3. Modo de acción propuesto para las toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en el intestino medio de un insecto blanco	20

## RESUMEN

En este trabajo se reporta el efecto de 12 cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* (*B. thuringiensis*) (mezcla esporas cristales), aisladas de suelos agrícolas del Estado de Morelos, en larvas de primer estadio de *Spodoptera frugiperda* y *S. exigua*. De 12 cepas utilizadas (IB5, IB6, IB10, IB13, IB16, IB23, IB26, IB36, IB37, IB50, IB79 e IB156), solamente seis de ellas (IB5, IB10, IB13, IB16, IB36 e IB37) y los controles positivos (HD-1 y HD-137) produjeron mortalidad significativa en *S. frugiperda* en los bioensayos preliminares. La cepa HD-137 (usada como control positivo) fue efectiva a una concentración de 200 ng/cm<sup>2</sup> de superficie de dieta en tanto que la HD-1 (control positivo), y las nativas IB10 e IB16 fueron efectivas a 2000 ng/cm<sup>2</sup>.

También observamos que, en general, las larvas sobrevivientes regularmente presentaron menor talla con respecto al control, después de siete días que tardó el bioensayo. Las cepas IB6, IB23, IB26, IB50, IB79 e IB156 no mostraron efecto alguno aún en la concentración máxima de 2000 ng/cm<sup>2</sup>. La concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de las cepas activas fue inferior a 400 ng/cm<sup>2</sup>, siendo nuevamente la cepa más activa la HD-137 con un valor promedio de CL<sub>50</sub> de 174.3 ng/cm<sup>2</sup>. También se analizó el posible desarrollo de resistencia y efecto en la pupación en *S. frugiperda* usando concentraciones subletales de *B. thuringiensis* con las cepas GM-10 y HD-137. En estos experimentos no fue posible obtener conclusiones definitivas respecto al desarrollo de resistencia, pues al parecer las concentraciones empleadas afectaron el desarrollo de las larvas así como la fecundidad de los adultos que lograron emerger. Aún cuando había oviposición normal, nunca observamos eclosión de larvas de primer estadio a partir de esas masas de huevos después de la tercera generación.

No se realizaron ensayos preliminares con *S. exigua*. Sin embargo, con la concentración más baja usada (100 ng/cm<sup>2</sup>) en las pruebas de CL<sub>50</sub> se observó al menos un 60% de mortalidad en las cepas IB5, IB10, IB13 e IB16; llegando a ser hasta del 100% en las cepas IB36, IB37, HD-1 y HD-137. Igualmente se observó una disminución en la talla de las larvas sobrevivientes desde un 20% hasta un 40% al cabo de siete días. Las formulaciones insecticidas microbianas empiezan a tener una buena aceptación, por lo que la búsqueda de nuevas cepas nativas más potentes y selectivas son de gran importancia.

## INTRODUCCION

Desde que el ser humano se hizo sedentario, comenzó a cultivar plantas y a domesticar animales para alimento y vestido, tuvo necesidad de combatir a los elementos nocivos (como los insectos, otros invertebrados y, aun, vertebrados) que disminuían la producción. Con el adventimiento de métodos modernos en la agricultura, pudo mejorarse la producción de alimentos pero también hubo una consecuencia importante: aparecieron las plagas causantes de daños a plantas cultivadas y, entre las más sobresalientes, los insectos. Aun cuando las formas adultas de estos artrópodos suelen causar daño a las plantas, son las formas inmaduras las que, sin duda, constituyen el verdadero problema para la agricultura (Equihua y Anaya 1990).

Tradicionalmente, el maíz ha sido utilizado como alimento básico en México por lo que representa uno de los principales cultivos en la agricultura de temporal y de riego. Sin embargo, el rendimiento real se ve disminuido por la pérdida de fertilidad del suelo, un régimen pluvial imprevisible en las regiones temporaleras y, además, por el ataque de insectos plaga. Uno de los insectos plaga más importantes durante todo el ciclo de desarrollo del maíz es el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda* Smith) (Lepidoptera:Noctuidae). Además del maíz, también puede atacar a la alfalfa, frijol, papa, diferentes especies de pastos, sorgo, soya y el tomate de cáscara. Esta especie ataca fundamentalmente el "cogollo" de las plántulas de maíz (sitio donde se localiza el meristemo de crecimiento), donde se alimenta de las hojas en formación perforándolas severamente. El ataque temprano del GCM retarda el desarrollo o causa la muerte de las plántulas de maíz (Morón y Terrón 1988). Otra plaga de importancia es *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidoptera:Noctuidae) también llamada "gusano soldado del algodónero", la cual puede alimentarse de una gran variedad de cultivos entre otros el

ajonjolí, alfalfa, melón, arroz, soya, sorgo, tomate de cascara, jitomate, linaza, papa, cartamo, garbanzo, e incluso llega a atacar a plantas ornamentales como el crisantemo (Malais 1992). Para reducir las pérdidas provocadas por plagas como *S. frugiperda*, varios métodos han sido utilizados, desde el control químico hasta el control manual, especialmente en parcelas de maíz de subsistencia donde la aplicación química no es costosa (Romero 1993). Sin embargo, el uso de productos químicos es el método de control más extendido; desde un punto de vista práctico, los pesticidas químicos ocasionan la muerte de toda o de casi toda la población de una determinada plaga en poco tiempo y además es posible eliminar varias plagas con un solo producto. Aún así, el valor insecticida que representan éstos productos se ha visto disminuido debido a que dejan residuos persistentes tanto en el ambiente (suelo, agua, aire) como en los tejidos vegetales y animales con la consecuente acumulación en las cadenas tróficas (Chauvin 1967). Por otro lado, los insecticidas químicos someten a los insectos plaga a una fuerte presión de selección por lo que son capaces de desarrollar resistencia a los productos químicos. Sawicki (1979) ha calculado que aproximadamente el orden lepidóptera presenta al menos 52 especies resistentes, en tanto que los ordenes coleóptera 56, acarina 43 y homóptera-himenóptera 41. Actualmente, hay más de 500 especies de ácaros e insectos que han desarrollado resistencia (Lambert y Peferoen 1992). Aún más, el acelerado deterioro ambiental, el alto costo de adquisición y aplicación, así como los riesgos a la salud humana que implica el uso de insecticidas químicos, han dado la pauta para buscar y desarrollar alternativas menos dañinas. Así, las nuevas estrategias de control deberán orientarse hacia un manejo de plagas efectivo y natural que permita obtener una producción agrícola rentable (Abarca et al. 1991, Carpenter 1992).

## OBJETIVOS

Evaluar el efecto tóxico de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en larvas de primer estadio de *Spodoptera frugiperda* Smith y *Spodoptera exigua* (Hübner) (Lepidóptera:Noctuidae).

Analizar el posible desarrollo de resistencia de *Spodoptera frugiperda* a las toxinas de *Bacillus thuringiensis*, cepas GM-10 y HD-137.

Analizar las alteraciones fisiológicas (excreción y pupación) provocadas por concentraciones subletales de toxinas de *Bacillus thuringiensis*, cepas GM-10 y HD-137, en *Spodoptera frugiperda*.



## ANTECEDENTES

**INSECTICIDAS MICROBIANOS.** Todos los organismos son susceptibles de ser atacados por diferentes tipos de microorganismos y los insectos no son la excepción. Como parte de los programas existentes de manejo integrado de plagas (MIP), una de las alternativas propuestas es el uso de entomopatógenos capaces de enfermar a su hospedero hasta llevarlo a la muerte (Coulson y Witter 1990). Entre los patógenos de insectos, se incluyen especies de diferentes grupos taxonómicos como los virus (Fuxa 1990), bacterias (Feitelson et al. 1990), rickettsias (Aronson et al. 1986), hongos (McCoy 1990), protozoarios (Henry 1990) y nemátodos (Kaya 1990). De todos estos grupos destaca el de las bacterias las cuales han tenido un gran auge durante los últimos años (Technology Impact Reports 1990). La mayoría de los virus, bacterias y protozoarios son ingeridos por los insectos al alimentarse; en cambio los hongos invaden al insecto a través del tegumento intacto (Coulson y Witter 1990).

Las formulaciones químicas de pesticidas constituyen una parte importante del mercado comercial a nivel mundial. No obstante, los pesticidas biológicos o biopesticidas representan menos del 1% de los productos disponibles en el mundo (aproximadamente 20 billones de dólares) (Technology Impact Reports 1990, Van Rie 1992). Su penetración ha sido significativa solo recientemente, quizás por el arraigado uso de los insecticidas químicos empleados por décadas cuya ventaja es la de actuar rápidamente y matar a varias plagas de un área agrícola determinada. En cambio, los insecticidas microbianos son de acción más lenta y dada su alta especificidad sólo se elimina a un tipo particular de plaga. Otro de los problemas relacionados con los insecticidas microbianos es su permanencia en el campo, pues son muy

susceptibles a factores físicos ambientales que los inactivan. Sin embargo, actualmente se han desarrollado técnicas que les permiten permanecer largos periodos de tiempo expuestos a factores físicos inactivantes (Feitelson et al. 1990, Jones et al. 1991, Van Rie 1992).

Así como los insecticidas químicos pasan por un proceso de regulación antes de salir al mercado (para probar la seguridad en su producción y uso), también los insecticidas microbianos requieren ser regulados. Comparativamente al tardado proceso para completar su registro con pruebas de seguridad al que deben someterse los productos químicos (5-7 años y un costo por arriba de los 40 millones de dólares), en el caso de los insecticidas microbianos el proceso solo tarda de uno a dos años y tiene un costo alrededor de los dos millones de dólares (Technology Impact Reports 1990, Abarca et al. 1991).

Son varias las ventajas que tienen los insecticidas microbianos sobre las contrapartes químicas (Coulson y Witter 1990, Galán 1990), entre otras: ocurren naturalmente en muchos ecosistemas; hay ausencia de toxicidad para plantas y animales (incluidos insectos no "blanco" y el hombre); son extraordinariamente específicos en cuanto a su toxicidad contra determinados insectos "blanco"; no dejan residuos tóxicos por lo cual no contaminan el ambiente (son degradables); no hay dependencia de una sola materia prima para su producción; se pueden presentar estados de resistencia o letargo para soportar condiciones adversas, por lo que se pueden almacenar por mucho tiempo. Esta última condición permite que los insecticidas microbianos sean usados con un alto grado de confiabilidad en programas de MIP.

**UN PATÓGENO PROMETEDOR: "Bacillus thuringiensis".** Como ya se mencionó, algunos grupos de bacterias son patógenas a insectos, muchas de las cuales

pertenecen a las familias *Pseudomonadaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Micrococaceae*, *Lactobacillaceae* y *Bacillaceae*. La mayoría de las especies bacterianas formadoras de esporas patógenas a insectos pertenecen a la familia *Bacillaceae* (Ibarra 1992). Aunque se han reportado cerca de 100 especies bacterianas como entomopatógenas, solo cuatro se han considerado como promisorios agentes de control de insectos: *Bacillus thuringiensis*, *B. popilliae*, *B. lentimorbus*, y *B. sphaericus*. De estas sólo *B. sphaericus* no se ha producido a nivel comercial (Abarca et al. 1991, Crook y Jarret 1991).

**CARACTERÍSTICAS DE *Bacillus thuringiensis*:** *Bacillus thuringiensis* es una bacteria cosmopolita, aeróbica, gram positiva, de forma bacilar, habitante de la flora normal del suelo y de otros hábitats como el filopiano de las plantas y el polvillo en los silos donde se almacenan granos. Esta especie bacteriana tiene un amplio rango de insectos hospederos incluyendo lepidópteros, dípteros y coleópteros (Höfte y Whiteley 1989), y más recientemente malófagos (Drummond et al. 1992) (tabla 1). Esta bacteria se caracteriza fundamentalmente por producir una inclusión citoplásmica (o cuerpo parasporal) que contiene el factor tóxico conocido como  $\delta$ -endotoxina (delta-endotoxina). Algunas otras cepas suelen producir otros tipos de toxinas (Bulla et al. 1981, Fast 1981, Feitelson et al. 1990).

**INICIOS COMO BIOINSECTICIDA.** El científico japonés S. Ishiwata aisló a *B. thuringiensis* por primera vez en 1902 a partir de larvas enfermas del gusano de seda *Bombyx mori*, a la que se llamó *Sotto bacillus* por la aparente muerte súbita que producía en las larvas y aunque describe la especie, no la

Tabla 1. Algunos ejemplos de insectos susceptibles a las  $\delta$ -endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*.

NOMBRE COMUN	FAMILIA Y ESPECIE	REFERENCIA(S)
<b>ORDEN MALLOPHAGA</b>		
	TRICHOECTIDAE <i>Damalinia ovis</i>	Drummond et al. 1992
PIOJO		
<b>ORDEN HOMOPTERA</b>		
	AFIDIDAE <i>Acyrtosiphon pisum</i> <i>Rhopalosiphum maidis</i>	Payne y Cannon 1993 Aranda et al. 1993
FULGOR DEL CHICHARO AFIDO PRIETO DEL MAIZ		
<b>ORDEN COLEOPTERA</b>		
	SCARABAEIDAE	Ohba et al. 1992
GALLINA CIEGA		
	CHRYSOMELIDAE <i>Chrysomela scripta</i> <i>Diabrotica</i> spp. <i>D. undecimpunctata</i> <i>Leptinotarsa</i> <i>dececlineata</i>	Bauer y Pankratz 1992 Mycogen 1992 Kupar et al. 1991 Kupar et al. 1991 Lambert et al. 1992 Bravo et al. 1992a,b
ESCARABAJO DE LA HOJA GUSANO DE LA RAIZ GUSANO DE LA RAIZ ESCARABAJO DE LA PAPA		
	CURCULIONIDAE <i>Hypera postica</i>	Mycogen 1992
GORGORO DE LA ALFALFA		
<b>ORDEN LEPIDOPTERA</b>		
	NOCTUIDAE <i>Spodoptera litura</i> <i>S. littoralis</i>	Whitlock et al. 1991 Nayon et al. 1990
GUSANO TROZADOR GUSANO EGIPCIO DEL ALGODON GUSANO DEL FRUTO GUSANO DEL FRUTO	<i>Helicoverpa armigera</i> <i>H. punctigera</i> <i>Earias insulana</i>	Teakle et al. 1992 Teakle et al. 1992 Nayon et al. 1990
GUSANO DE LA YEMA OCCIDENTAL GUSANO DE LA YEMA DEL FINO	TORTRICIDAE <i>Choristoneura</i> <i>occidentalis</i> <i>Ch. fumiferana</i>	Nirva et al. 1987 Van Frankenhuyzen y Gringorten 1991
HARENADOR EUROPEO DEL MAIZ	PYRALIDAE <i>Ostrinia nubilalis</i>	McGuire et al. 1990
GUSANO BARRENADOR GUSANO BARRENADOR DE LA COL	PIERIDAE <i>Pieris rapae</i> <i>P. brassicae</i>	McDonald et al. 1990 Martens 1990
PALOMILLA GITANA	LYMANTRIDAE <i>Lymantria dispar</i>	Dubois et al. 1988
PALOMILLA DORSO DE DIAMANTE	PLUTELLIDAE <i>Plutella xylostella</i>	Ferré et al. 1991
GUSANO CORNUDO DEL TABACO	SPHINGIDAE <i>Manduca sexta</i>	Hofte et al. 1990

ORDEN DIPTERA		
MOSCA DE LA ACEITUNA	TEPHRITIDAE <i>Dacus oleae</i>	Karamandilou <i>et al.</i> 1991
QUIRONOMIDOS	CHIRONOMIDAE <i>Rhocolanytarsus sp.</i>	Holloy 1992
SIMULIDOS	SIMULIIDAE	Holloy 1992
MOSCA DOMESTICA	MUSCIDAE	Indrasith <i>et al.</i> 1992
MOSCA COPROFAGA	SCIARIDAE <i>Bradysia coprophila</i> <i>Lycoriella mali</i>	Osborne <i>et al.</i> 1985 Cantwell y Cantelo 1984
MOSQUITO	CULICIDAE <i>Aedes aegypti</i>	Ward y Ellar 1987

publica formalmente. Sin embargo, alrededor de 1915 Berliner la describe taxonómicamente adjudicándosele así su descubrimiento y además sugiere su uso como insecticida basado en otra cepa (subespecie *thuringiensis*) aislada de un molino en Thuringen, Alemania (Starnes et al.1993). En los últimos 30 años tanto en los Estados Unidos como en Europa se han elaborado varios insecticidas comerciales para controlar formas larvarias de lepidópteros y dípteros plaga (Feitelson et al.1989, Ware 1991, Beegle y Yamamoto 1992, Starnes et al.1993) (tabla 2).

En 1956 Angus demostró que el ingrediente activo tóxico para lepidópteros era una proteína (conocida como  $\delta$ -endotoxina [ $\delta$ -endotoxina]) contenida en una inclusión cristalina de forma bipiramidal. Posteriores trabajos demostraron que la proteína activa contra lepidópteros producida por *B. thuringiensis* var. *kurstaki* es una mezcla de cuatro o más proteínas diferentes que forman a la protoxina. (Aronson y Wu 1990, Feitelson et al.1992).

Hoy en día, *B. thuringiensis* es el entomopatógeno de mayor producción y distribución en el mundo. Se calcula que se utilizan alrededor de 2.3 millones de Kg de bioinsecticidas a base de *B. thuringiensis* anualmente, pudiéndose encontrar en diferentes presentaciones como polvos, líquidos, granulados, pellets (pequeñas pastillas) (Abarca et al. 1991, Catálogo Oficial de Plaguicidas 1991). Como se mencionó anteriormente *B. thuringiensis* puede producir varias toxinas que se liberan en el medio de cultivo durante su desarrollo, las cuales se mencionan brevemente a continuación:

TABLA 2. PRODUCTOS COMERCIALES A BASE DE DELTA ENDOTOXINA DE  
*Bacillus thuringiensis*

A. *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

NOMBRE COMERCIAL:	LABORATORIO:
DIPEL BIOBIT THURICIDE JAVELIN BACTOSPEINE LARVO-BT FORAY CATERPILLAR ATTACK FOIL BFC FUTURA MUP AGREE WORMBUSTER BATHURIN 82 BIODART	ABBOT LABS. NOVO NORDISK SANDOZ, INC. SANDOZ, INC. NOVO NORDISK  NOVO NORDISK  ECOGEN NOVO NORDISK MYCOGEN CORP. CIBA GEIGY BACTER JZD SLUSOVICE ICI

B. *B. thuringiensis* var. *israelensis*.

TEKNAR VECTOBAK BACTIMOS SKEETAL MOSQUITO ATTACK BACTIMOS BRIQUETS MOSQUITO ATTACK RINGS ACROBE BACTOKULICID MOSKITUR	SANDOZ, INC. ABBOT LABS. NOVO NORDISK NOVO NORDISK  AMERICAN VPOBIOPREPARAT JZD SLUSOVICE
--	--

C. *B. thuringiensis* var. *aizawai*.

CERTAN FORBAC CENTARI	SANDOZ, INC. NOVO NORDISK ABBOT LABS.
-----------------------------	---

D. *E. thuringiensis* var. *san diego*.

M-ONE CONDOR TRIDENT CUTLASS M-ONE PLUS	MYCOGEN CORP. ECOGEN SANDOZ, INC. ECOGEN MYCOGEN CORP.
---	--

E. *B. thuringiensis* var. *tenebrionis*.

GNATROL NOVODOR TRIDENT FOIL M-TRACK TRIDENT II DI TERRA M-ONE	ABBOT LABS. NOVO NORDISK SANDOZ, INC. ECOGEN MYCOGEN SANDOZ AGRO, INC. ABBOT LABS. MYCOGEN
---	---



a).  $\alpha$ -exotoxina o exotoxina termolábil, soluble en agua y tóxica a insectos (Fast 1990). Según Toumanoff (1953), esta toxina es una lecitinasa-C, pero se ha confirmado que no lo es (Beegle et al. 1992).

b).  $\beta$ -exotoxina, thuringiensina o también llamada factor mosca por actuar sobre distintos géneros inmaduros de mosca. Es soluble en agua, termoestable, de alta toxicidad para larvas de algunas especies de mosca. Químicamente se define como un nucleótido de adenina análogo al ATP. Su toxicidad se debe a que inhibe al DNA que dirige a la RNA polimerasa por competencia con el ATP inhibiendo así la síntesis de RNA. Se han identificado diferentes tipos de  $\beta$ -exotoxina con distinto espectro de actividad; ésta toxina es más tóxica inyectada por vía parental que por ingestión oral tanto en insectos como en vertebrados. Por sus efectos teratogénicos, y posiblemente mutagénicos, el uso de esta toxina está estrictamente regulado en los Estados Unidos, pues se ha detectado citotoxicidad para vertebrados y su empleo es sumamente riesgoso para humanos (Burgess 1981, Fast 1981, Sebasta et al. 1981, Van Rie 1992).

c).  $\gamma$ -exotoxina es de origen proteico, termolábil a 60°C por espacio de 10 minutos, y sensible al aire y a la luz del sol. Se vierte al medio durante la fase logarítmica de crecimiento de la bacteria (Fast 1981).

d)  $\delta$ -endotoxina (delta-endotoxina), toxina cristalina o solamente llamada cristal, la cual tiene propiedades entomocidas. El espectro de acción de esta toxina es amplio ya que actúa sobre estados inmaduros de diversos grupos de insectos (Fast 1981, Feitelson et al. 1992, Van Rie 1992).

e). También se produce una toxina que actúa sobre ratones y otra de fácil descomposición (Valenzuela 1990).

f). Para algunas especies de insectos, las esporas también contribuyen significativamente a la actividad insecticida (Beegle y Yamamoto 1992, Van Rie 1992, Miyasono et al. 1994) mientras que en otras juega un papel casi nulo o no tiene toxicidad. Existe una estrecha similitud serológica entre las proteínas de la cubierta de la spora con las proteínas del cristal, lo cual hace pensar que la  $\delta$ -endotoxina pudiera ser un exceso de cubierta proteica de la spora (Dulmage 1981).

Otros factores producidos que pudieran jugar un papel significativo en la toxicidad de la bacteria son dos inmunoinhibidores denominados A y B. El factor A es un polipeptido que inhibe la actividad antimicrobiana de la hemolinfa del insecto y el B que parece ser una sustancia no proteica y que también inhibe la actividad antimicrobial (Van Rie 1992).

**CARACTERÍSTICAS DEL CRISTAL.** La capacidad insecticida de *B. thuringiensis* reside principalmente en la  $\delta$ -endotoxina contenida en un cristal parasporal que se forma y acumula durante el proceso de esporulación. Los cristales representan del 20 al 30 % del peso seco de los cultivos esporulados y están constituidos por una o más proteínas, de las cuales algunas son  $\delta$ -endotoxinas (Van Rie 1992). El cristal es un agregado de moléculas proteicas comunmente de forma bipiramidal aunque puede tener muchas otras formas o simplemente ser amorfo (lo cual puede deberse al serotipo). En promedio mide 15 nm de longitud, un diámetro aproximado de 5 nm y un peso molecular de 230 000 Daltones (Fast 1981) (Figura 1). El cristal proteico contiene aproximadamente 5 % de carbohidratos aunque probablemente no tienen

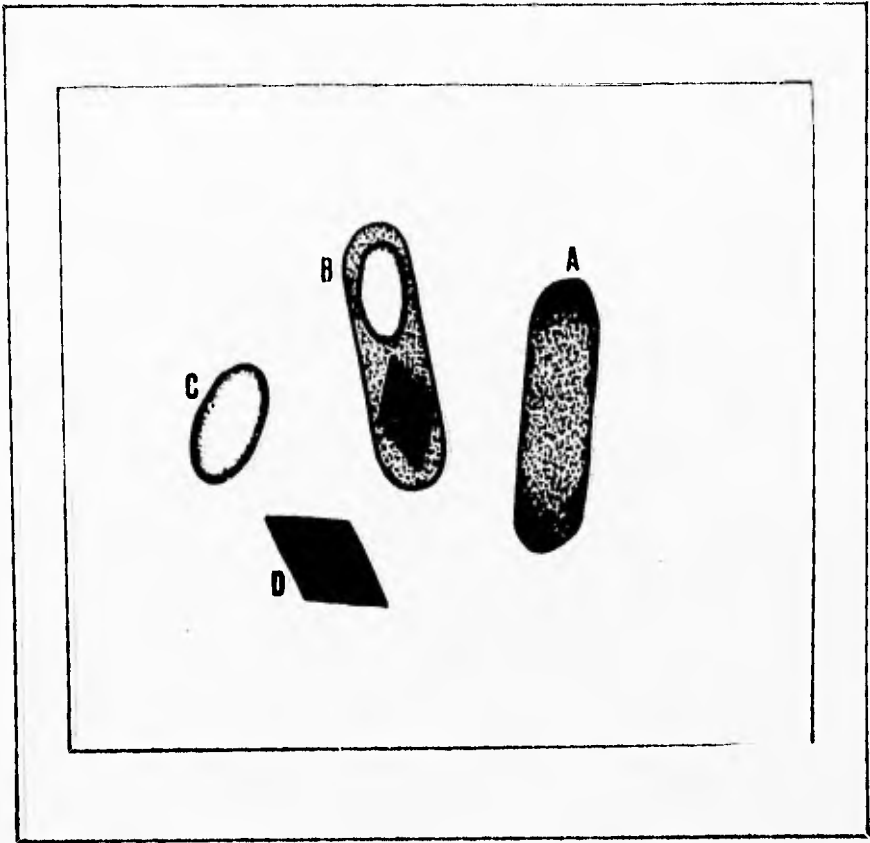


Figura 1. Diferentes estados de desarrollo de *Bacillus thuringiensis*.  
A, célula vegetativa; B, célula esporulando; C, espora; D, cristal.

Tomado de "Ibarra, J.E.. 1992, Biología y aplicación de las bacterias entomopatógenas. **Tercer Curso de Control Biológico**, Sociedad Mexicana de Control Biológico, Cuautitlán-Izcalli, Edo. de México.

un papel importante en la toxicidad. No presentan ácidos nucleicos ni lípidos pero se han detectado restos de calcio, hierro, magnesio y silicio (Bulla et al. 1977, Fast 1981).

La diversidad de los cristales proteicos producidos por *B. thuringiensis* se debe a la presencia de diferentes tipos de  $\delta$ -endotoxinas, tanto por su rango de hospederos como por su peso molecular (composición y cantidad de cadenas peptídicas), así como por la susceptibilidad al ataque de enzimas como la tripsina, la reacción con anticuerpos, el espectro insecticida o el grado de solubilidad (Fast 1981, Van Rie 1992). Por ello, diferentes serotipos o variedades han sido detectadas. Las diversas cepas que se han aislado de *B. thuringiensis* se clasifican de acuerdo a sus antígenos flagelares II, al tipo de cristal proteico, al patrón de esterasas, a su patogenicidad y a determinadas características bioquímicas (Van Rie 1992). Generalmente, cada célula vegetativa produce un cristal, exceptuando algunos aislamientos que producen de 2 a 5 cristales por célula (Fast 1981, Beegle y Yamamoto 1992).

**FORMACION DEL CRISTAL.** Después de un rápido periodo de desarrollo vegetativo de la célula de *B. thuringiensis*, se inicia la formación de una endospora resistente a las condiciones adversas del ambiente. Es durante la formación de la espora, en la fase estacionaria, cuando se forma el cristal. La secuencia de eventos indica que el cristal puede ser detectado microscópicamente en sus inicios de formación durante la última parte de la fase II de la esporulación. Aunque su mayor crecimiento se da en las fases III y IV, los cristales pueden continuar agrandándose incluso hasta la fase VI (Benchtel y Bulla 1976, Fast 1981). Micrografías de los cristales nacientes

los muestran rodeados por ribosomas y asociados a la membrana citoplásmica (Figura 2).

**MODO DE ACCION.** Una vez que el insecto ha ingerido los cristales proteicos con el alimento, estos son solubilizados en el ambiente alcalino del intestino medio (en el caso de los lepidópteros el pH va de 9 a 12 [Goldburg y Tjaden 1990, Terra 1990]) fragmentándose en unidades proteicas conocidas como protoxinas. Sin el paso previo de solubilización, las proteínas no tendrían ninguna actividad tóxica (Dulmage 1981), por lo que el pH alcalino juega un papel importante en la solubilización de los cristales proteicos.

Las protoxinas tienen un peso molecular de 130 a 140 Kilodaltones (Kda), son termolábiles y pueden ser hidrolizadas proteolíticamente para hacerse activas, es decir, al removerse el extremo carboxilo terminal se forma la toxina propiamente. El extremo carboxilo tiene de 60 a 70 Kda y aunque contiene muchos residuos de cisteína necesarios para mantener la estructura cristalina no parecen estar relacionados con la toxicidad (Goldburg y Tjaden 1990, Van Rie 1992). El fragmento tóxico del cristal está localizado en el extremo amino terminal de la protoxina. La toxina activa, conocida como  $\delta$ -endotoxina, es un fragmento proteico de 60 a 70 Kda de peso molecular. Aún no queda claro si las  $\delta$ -endotoxinas específicas actúan independientemente, pues en algunos casos hay evidencia de sinergismo entre diferentes  $\delta$ -endotoxinas, aunque en otras cepas no se observa éste comportamiento (Feitelson *et al.* 1990, Van Rie 1992).

La toxina activa actúa sobre las microvellosidades apicales de las células epiteliales del intestino medio del insecto blanco, donde se localizan

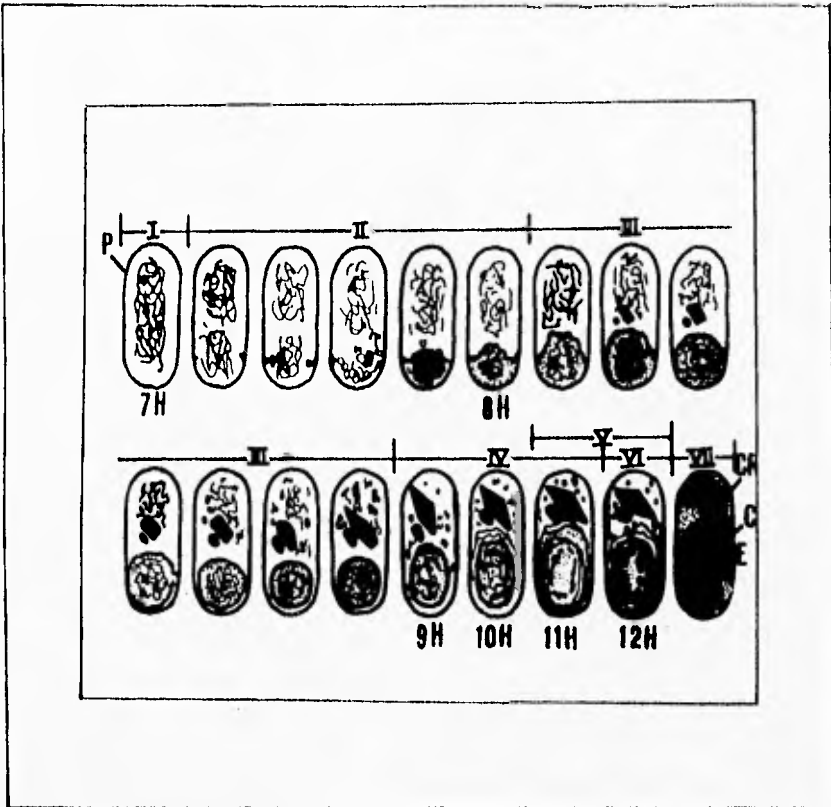


Figura 2. Esporulación de *Bacillus thuringiensis* y formación de cristal proteico. P, pared celular; CR, cristal proteico; C, cubierta esporal; E, espora madura.

Tomado de "Fast, P.G. 1961. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*.

En: *Progress in the microbial control of pest and plant diseases*. H.D. Burges, Ed. London, Academic Press.

receptores específicos de naturaleza glicoproteica (Gill et al.1992). Al parecer, se forma un poro no selectivo cuyo radio es de 0.6 nm por la inclusión de seis moléculas de toxina a manera de anillo sobre la membrana. Se producen entonces cambios estructurales y fisiológicos en el epitelio intestinal, que perturban la permeabilidad de la membrana e interfieren con la bomba de potasio ( $K^+$ ). Estos poros son canales de escape de coloides principalmente, permitiéndose así el flujo de agua con lo que se llega a una lisis coloido-osmótica celular (Bravo et al. 1992a, b, Gill et al.1992, Van Rie 1992) (Figura 3). El primer efecto que se observa en las larvas es una parálisis del intestino, por lo que las larvas no se alimentan; los insectos susceptibles rara vez recobran el apetito y la inanición contribuye en parte a su muerte, ya que al mismo tiempo se está produciendo una desintegración del epitelio intestinal medio, seguido de una mezcla en el hemocoele del contenido intestinal que finalmente es la causa más directa de la muerte de las larvas susceptibles en uno a siete días (Gelernter 1992).

**INSECTOS "BLANCO": "ESPECIFICIDAD".** Los cristales proteicos producidos por *B. thuringiensis* varían según su estructura primaria (secuencia de amino ácidos) y por el espectro insecticida de los productos codificados por los genes *cry* por lo que existen diferentes tipos de toxinas. Las  $\delta$ -endotoxinas se designan como proteínas Cry, en tanto que los genes que las codifican se designan como genes *cry*. Así, las  $\delta$ -endotoxinas se han clasificado en seis clases mayores y varias subclases según el organismo blanco (insectos u otros artrópodos para los cuales son específicas). Las toxinas CryI actúan exclusivamente sobre lepidópteros, el tipo CryII es específica para lepidópteros y dípteros, el tipo CryIII es específica para coleópteros, el tipo CryIV actúa contra dípteros y los tipos CryV y CryVI actúan sólo contra

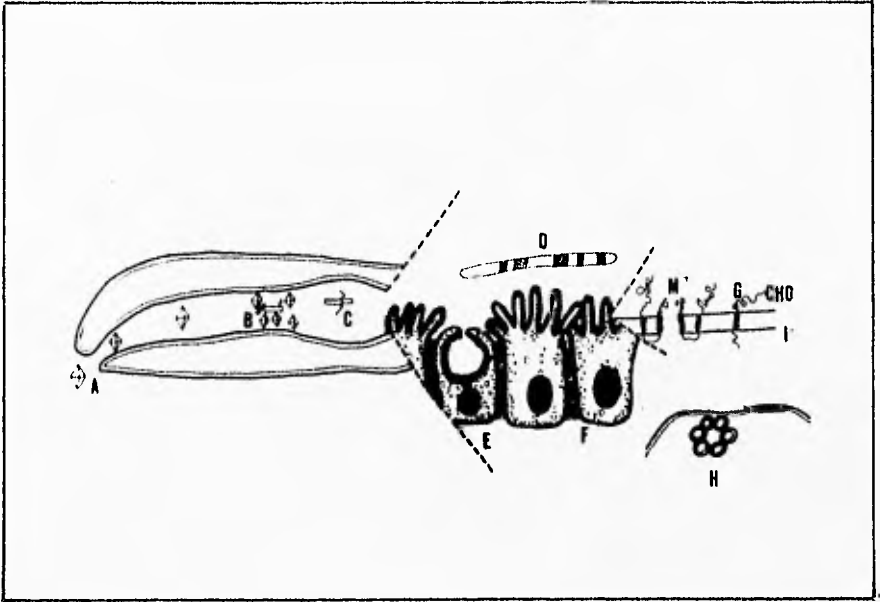


Figura 3. Modo de acción propuesto para las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en el intestino medio de un insecto blanco. A, cristal proteico; B, Solubilización del cristal por el pH alcalino (9-12) del intestino medio; C, proteólisis del extremo carboxilo; D, extremo amino o porción tóxica de la  $\delta$ -endotoxina; E, célula goblet; F, célula columnar; G, receptores en la membrana apical de las células columnares; H, inserción de seis moléculas de toxina por cada poro; I, membrana celular.



nematodos (Feitelson et al.1992, Van Rie 1992). Sin embargo, entre 1976 y 1982, las toxinas producidas por *B. thuringiensis*, se probaron contra un rango muy amplio de organismos pero con resultados poco consistentes (De Barjac 1984).

Cada tipo de  $\delta$ -endotoxina tiene características muy particulares que determinan en parte su especificidad. El tipo CryI es muy común en casi todos los serotipos de *B. thuringiensis*. Se han reportado ocho subclases de esta toxina, de las que tres se relacionan estrechamente en su secuencia de amino ácidos: CryIA (con las variaciones CryIAa, CryIAb y CryIAc), CryIB, CryIC, CryID, CryIE y CryIF. Su peso molecular varía de 131 a 138 Kda y la  $\delta$ -endotoxina se acumula en cristales de forma bipiramidal (Höfte y Whiteley 1989, Van Rie 1992).

El tipo CryII tiene dos subclases de  $\delta$ -endotoxinas que difieren en su espectro de actividad, ya que una de las subclases actúa indistintamente sobre lepidópteros y dípteros en tanto que la otra actúa sólo sobre lepidópteros; ambas subclases de toxinas tienen un peso molecular de 70.9 Kda por lo que la diferencia en su espectro de acción se encuentra en su secuencia nucleotídica pues sólo comparten el 87% de amino ácidos homólogos. Esta  $\delta$ -endotoxina se acumula en cristales cuboidales y se presentan solamente en cepas de algunas subespecies como son *kurstaki*, *thuringiensis*, *tolworthi* y *kenyae* (Höfte y Whiteley 1989, Van Rie 1992).

En el tipo CryIII hay cuatro subclases: CryIIIA, CryIIIB, CryIIIC y CryIIID con pesos moleculares de 73.0 a 129.4 Kda. Los tipos CryIIIA, CryIIIB y CryIIID están contenidos en cristales romboidales, aunque se ha purificado

una  $\delta$ -endotoxina CryIIIC específica para coleópteros contenida en cristales bipiramidales (Van Rie 1992).

Para el tipo CryIV existen las subclases CryIVA, CryIVB, CryIVC y CryIVD con pesos moleculares que van de 72.4 a 134 Kda. Todas estas  $\delta$ -endotoxinas están presentes en *B. thuringiensis* var. *israelensis*, y se acumulan en cristales ovoidales (Höfte y Whiteley 1989, Van Rie 1992).

El tipo CryV se ha dividido en tres subclases pero aún no se ha reportado el peso de la proteína ni la forma del cristal. En cuanto al tipo CryVI sólo se reconoce que debe tener un origen evolutivo diferente a las demás proteínas (Feitelson et al. 1992).

En resumen, lo que determina el espectro de actividad de la  $\delta$ -endotoxina depende de varios factores. El tipo de toxina, la composición del lumen del intestino del insecto (que según la especie tendrá un rango de pH así como cierto tipo y concentración de proteasas) y factores ambientales que influyan en la solubilización de los cristales, la posterior liberación del fragmento tóxico y la unión a los receptores membranales si están presentes (Van Rie 1992).

**ANTECEDENTES DE SU USO EN MEXICO.** El uso de productos elaborados a base de *B. thuringiensis* se reporta desde 1959 cuando se obtuvieron resultados satisfactorios a una concentración de 20 ppm contra el "gusano de la col" (*Pieris elodea*), el "gusano del nogal" (*Hypantria cunea*) y la "conchuela del frijol" (*Epilachna varivestis*) (no se reporta de que cepa se trata). Posteriormente, durante la década de los setentas se llegó a producir

en nuestro país un insecticida a base de *B. thuringiensis* llamado TURIBAC que en la actualidad ya no se produce (Abarca et al. 1991). Actualmente, México importa varias marcas autorizadas como Baxil, Biobit, Dipel, Javelin, Novo y Thuricide en varias presentaciones calculándose que para 1990 se importaron cerca de 100 toneladas (Hernandez 1988, Catálogo Oficial de Plaguicidas 1991).

**VENTAJAS Y DESVENTAJAS.** Anteriormente se mencionaron de manera general las ventajas que ofrecen los insecticidas microbianos. Sin embargo, estas pueden variar según el organismo que se utilice como control. Las formulaciones hechas a base de *B. thuringiensis* no contaminan el ambiente no dejan residuos tóxicos y son altamente específicas para el insecto "blanco". *B. thuringiensis*, la especie bacteriana que constituye la materia prima para preparar las formulaciones, se encuentra presente de manera natural en ambientes diversos (suelos agrícolas, de vegetación natural, el filoplano de las plantas, en insectos muertos y en el polvo de los granos en los silos). Los productos a base de *B. thuringiensis* "no son tóxicos para plantas y animales" ofreciendo seguridad de manejo para el hombre (exceptuando aquellos productos que contengan la  $\beta$ -exotoxina por su efecto mutagénico). Además de la seguridad que ofrecen los productos a base de *B. thuringiensis*, éstos pueden resultar más económicos pues con el avance en técnicas de fermentación se está logrando bajar los costos de producción (Coulson y Witter 1990, Technology Impact Reports 1990, Abarca et al. 1992).

No obstante las ventajas que presenta *B. thuringiensis* como materia prima de bioinsecticidas también se presentan algunas desventajas como es su poca estabilidad en el ambiente ocasionada por un sinnúmero de factores que incluyen: ciclos en la temperatura y humedad, rayos ultravioleta, foto-

oxidación e interacciones químicas así como actividad proteolítica y microbial para lo cual se ha desarrollado un sistema de microencapsulación o el uso de protectores como el carbón negro y el titanio que permiten obtener una mejor persistencia del producto en el campo (Feitelson et al. 1989).

Además los genes que codifican la producción de la  $\delta$ -endotoxina han sido clonados, siendo posible introducirlos y expresarlos en células vegetales, especialmente a través del uso de *Agrobacterium* como mediador, ofreciendo así la ventaja de dar un mejor control de las plagas que se alimentan de alguna parte de la planta que sea difícil de tratar por métodos convencionales (Fischhoff et al. 1987, Gill et al. 1992).

Otro aspecto importante que se ha manejado en los últimos años es la posibilidad de que los insectos plaga desarrollen resistencia a *B. thuringiensis*. La "palomilla del dorso de diamante" (*Plutella xylostella*) ha desarrollado notables niveles de resistencia en el campo a *B. thuringiensis* por el continuo uso de bioinsecticidas. Especies como *Plodia interpunctella* en granos almacenados también han desarrollado un alto nivel de resistencia (27 veces más resistente en dos generaciones que las poblaciones que no han sido expuestas a *B. thuringiensis*). A nivel de laboratorio, el "gusano del tabaco" (*Heliothis virescens*) y el "escarabajo de la papa" (*Leptinotarsa decemlineata*) también se han reportado con capacidad para desarrollar resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* (McGaughey 1990).

Se cree que el posible mecanismo biológico de resistencia a las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* incluya un cambio en el pH intestinal o en las enzimas que llevan a cabo la solubilización y activación del cristal. Pueden

presentarse también insectos mutantes que: a.) posean receptores insensibles a la toxina correspondiente, b.) que tengan capacidad para desintoxicarse, destruyendo o inactivando las toxinas, c.) sean incapaces de mover una toxina desde el sitio de producción o ingestión hasta su receptor, d.) por su comportamiento eviten la ingestión de la protoxina, y e.) son capaces de prevenir la activación de la toxina (pH alterado o ausencia de proteasas). Aún más, la probabilidad de aparición de resistencia depende de si las mutaciones son dominantes o recesivas o ligadas al sexo. Para el manejo de resistencia se propone la rotación de toxinas de *B. thuringiensis* con otras toxinas insecticidas o bien con otras estrategias de control cultural o biológico (Lockwood et al. 1984, Gill et al. 1992, Ferro 1993). En los insectos, al igual que en los demás organismos, se presenta una mayor susceptibilidad a las enfermedades cuando han sido sometidos a una situación adversa por lo que se ha pensado que una combinación de estrategias culturales, biológicas e incluso químicas faciliten la acción de las toxinas microbianas. Frakhaenel (1957), Pristavco (1963) y Telenga (1958) (citados por Escamilla y Aranda 1981) reportaron un aumento en la mortalidad de insectos por bacterias patógenas cuando previamente eran expuestas a bajas dosis de dicloro-difenil-tricloroetano (DDT).

## MATERIALES Y METODOS

**ORGANISMOS PARA LAS PRUEBAS.** Iniciamos la cría de *Spodoptera frugiperda* (Smith) y *Spodoptera exiqua* (Hübner) con masas de huevos y con larvas de primer estadio donadas por el Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y Trigo (CIMMYT) y colectadas directamente en cultivos de maíz en varios municipios del Estado de Morelos. Para ambas especies usamos una dieta meridica (Singh 1977) modificado por Mihn (1964) y en la Universidad de Nuevo León (Galán, comunicación personal). La formulación y preparación de la dieta se detalla en el apéndice II. En cada vaso con dieta se colocaron de 4 a 5 larvas de primer estadio e incubadas a condiciones constantes de temperatura y humedad relativa ( $27^{\circ}\text{C} \pm 1.5^{\circ}\text{C}$  y  $60\% \pm 5\%$  H.R.) y un fotoperiodo luz:oscuridad de 16:8 horas. Bajo estas condiciones, las larvas de ambas especies alcanzan su máxima talla en 13 a 15 días en promedio. Al llegar a su talla máxima, las larvas dejan de alimentarse y se preparan para pupar, enterrándose en los restos de alimento. Cuando la mayoría de las larvas de un lote determinado han pupado por completo, las pupas son retiradas del vaso, se enjuagan por 10 a 15 segundos en una solución de hipoclorito de sodio al 2.5 % y se secan en toallas de papel. Para incubar 10 a 15 pupas se agruparon en botes de plástico de dos litros revestidos con toallas secantes. Para evitar que los adultos emergidos pudieran escapar, la boca del bote se cubrió con tela de organza. En verano no hay gran diferencia en el tiempo de emergencia de los adultos por mantener los botes con las pupas a temperatura ambiente o en el cuarto de cría bajo las condiciones arriba señaladas, pero en invierno el tiempo de emergencia se puede prolongar manteniendo a temperatura ambiente los botes con las pupas, según los requerimientos que tuviésemos de adultos.

Los adultos fueron alimentados con una solución de sacarosa o miel al 10 %, la cual era renovada por lo menos cada tercer día. Después que los adultos copulaban libremente por 3 a 4 días, las hembras iniciaban la oviposición en las toallas secantes o en la tela de organza y ocasionalmente en los vasos de alimento (de textura plástica). Las masas de huevos colectadas se depositaron en cajas Petri, anotando la especie y fecha. Las condiciones de incubación fueron las señaladas anteriormente. Las masas de huevos que no fueron usadas inmediatamente, fueron refrigeradas a 4°C por 8 a 10 días como máximo. En 2 a 3 días nuevamente teníamos larvas de primer estadio para llevar a cabo los bioensayos correspondientes o para mantener la cría.

**OBTENCION DE CEPAS DE *B. thuringiensis*.** Las cepas nativas de *B. thuringiensis* (IB5, IB9, IB10, IB13, IB16, IB23, IB26, IB36, IB37, IB50, IB79 e IB156) se obtuvieron a partir de 148 muestras de suelos agrícolas, de vegetación natural y de terrenos baldíos colectados en la parte norte del Estado de Morelos. En cada localidad muestreada, se tomaron aproximadamente 100 g de la capa superficial del suelo o bien a profundidades de 20 a 40 cm. las muestras con datos de localidad, tipo de cultivo, altitud y características del suelo fueron transportadas al Instituto de Biotecnología (IRT) de la UNAM, donde se llevaron a cabo los aislamientos respectivos (Ortiz 1992, Ortiz et al. 1992). Este procedimiento se resume en el apéndice III.

**ENSAYOS DE MORTALIDAD.** Para las pruebas se usaron las cepas nativas antes mencionadas más dos cepas controles, la HD-1 (que posee los genes *cryIAa*, *cryIAb*, *cryIAc*, *cryIIA* y *cryIIB*) y la HD-137 (que posee los genes *cryIAa*, *cryIB*, *cryIC* y *cryID*). Los bioensayos fueron realizados en placas de poliestireno (Cell Wells, Corning, con 24 pozos de 16 mm de diámetro, No.

25820) cuyos pozos se llenaron con aproximadamente 2 ml de la dieta normalmente empleada para la cría. Sobre la dieta seca se extendió una capa de esporas-cristales y, posteriormente se colocó una larva de primer estadio por cada pozo (24 larvas por cada concentración probada). Finalmente, cada placa se cubrió con Saran Wrap (del tipo clean pack) para evitar que las larvas se escaparan de sus pozos. Sobre el plástico hicimos pequeñas perforaciones, para después colocar la tapa de la placa con bandas elásticas. Las placas con las larvas fueron mantenidas a las condiciones del cuarto de cría durante 7 días. Al término de este tiempo, contamos el número de larvas muertas así como la talla de las larvas sobrevivientes. Las concentraciones de toxina empleadas en este estudio se expresaron en nanogramos por centímetro cuadrado de superficie de dieta (ng/cm<sup>2</sup>).

Para determinar el rango de acción de las diferentes mezclas de esporas-cristales, inicialmente usamos una concentración de 200 y 2000 ng/cm<sup>2</sup>. Posteriormente se usaron las siguientes concentraciones: 50, 100, 200, 400, 800, 1500, 3000, 6000 y 12000 ng/cm<sup>2</sup>. Sin embargo, en ensayos posteriores descartamos las concentraciones de 50, 6000 y 12000 ng/cm<sup>2</sup> cuando encontramos que la mortalidad era muy baja o total respectivamente. Los resultados de mortalidad por concentraciones únicas fueron sometidos a análisis de varianza simple (Sharp 1979, Keppel 1982), mientras que los resultados de concentración/cepa se sometieron a análisis probit (Infante y Calderón 1980, Finney 1962).

**PRUEBAS DE RESISTENCIA Y EFECTO EN LA PUPACION.** La evaluación del posible desarrollo de resistencia y de efectos secundarios en la pupación producidos por las toxinas de *B. thuringiensis*, se llevaron a cabo en *S.*



*frugiperda*. Las cepas de Bt empleadas fueron la HD-137 (que posee los genes *cryIAa*, *cryIB*, *cryIC* y *cryID*) y la GM-10 (que posee el gen *cryIAb*, Pereyra 1992) de la colección del Laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo del IBT de la UNAM (Campus Cuernavaca). Estas cepas han mostrado ser muy tóxicas contra esta especie de lepidoptero. Las concentraciones aplicadas se expresaron en nanogramos de proteína por centímetro cuadrado de superficie de dieta ( $\text{ng}/\text{cm}^2$ ).

**RESISTENCIA.** Para cada prueba usamos 60 larvas de primer estadio. Cada larva fue depositada en un vasito de plástico de 10 ml, conteniendo 5 ml de la dieta de cría sobre la que extendimos diferentes diluciones de las mezclas esporas-cristales de las cepas HD-137 y GM-10. Para todas las larvas, las concentraciones de las mezclas esporas-cristales administradas estuvieron por debajo de la  $CL_{50}$ , calculada para estas cepas para *S. frugiperda* (174.34 y  $> 2000 \text{ ng}/\text{cm}^2$  respectivamente). Las concentraciones subletales administradas progresivamente a cada generación fueron 20, 30 y 40  $\text{ng}/\text{cm}^2$ . Cada experimento se hizo una sola vez. En cada prueba, se permitió que las larvas desarrollaran hasta el momento de pupar; en este momento, contamos el número de pupas logradas así como el número de adultos emergidos por cada generación.

Los adultos obtenidos fueron confinados para que copularan libremente y las hembras ovipositaran. Las masas de huevos obtenidas de insectos expuestos a una concentración sub-letal de toxina de *B. thuringiensis*, se incubaron y las larvas de primer estadio emergidas se expusieron a una concentración más alta de toxina.

**PUPACION.** Para determinar la aparición de efectos secundarios en el desarrollo larvario y durante el proceso de pupación de *S. frugiperda*, usamos

larvas de primer estadio alimentadas como en el caso del experimento de resistencia. Las concentraciones subletales empleadas fueron 50 y 100 ng/cm<sup>2</sup>. El desarrollo larvario fue monitoreado constantemente, anotándose cualquier anomalía en la producción de excremento y en el crecimiento. Al término del desarrollo de las larvas, registramos el número de pupas sanas y el número de malformaciones presentes. Todas la pupas fueron incubadas y finalmente se anoto el número de adultos normales y malformados.

## RESULTADOS

**BIOENSAYOS CON *S. frugiperda* Y *S. exigua*.** La diferencia de sobrevivencia en las larvas de *S. frugiperda* alimentadas con 200 y 2000 ng/cm<sup>2</sup> de la mezcla esporas-cristales de las cepas nativas de *B. thuringiensis* fue notable en seis de las doce cepas probadas. La mortalidad de las larvas de primer estadio fue significativa a 200 ng/cm<sup>2</sup> ( $F_{(12,60)}=16.64$ ,  $p<0.05$ ) (apéndice I, tabla 3). La cepa control HD-137 (la cual tuvo una sobrevivencia media [S.M.] de 2 larvas/repetición), fue significativamente diferente con respecto al resto de las cepas (Tukey  $d_{0.05}=0.7787$ , [Keppel 1982]) (apéndice I, tabla 4) siguiéndole en orden de importancia la cepa IB10 con 3 larvas vivas/repetición. En el resto de las cepas, la sobrevivencia de las larvas fue superior a la observada en HD-137 y la IB10, en tanto que en algunas otras la sobrevivencia fue total. A 2000 ng/cm<sup>2</sup> la diferencia en mortalidad producida fue altamente significativa ( $F_{(12,60)}=103$ ,  $p<0.05$  y  $p<0.01$ ) (apéndice I, tabla 5). La cepa control HD-1 y las cepas nativas IB10 e IB16 (S.M. de 0.2, 0.4 y 0.8 larvas/repetición respectivamente), mostraron mayor mortalidad con respecto a las demás cepas (Tukey  $d_{0.05}=0.8584$ ) (apéndice I, tabla 6). En importancia les siguieron las cepas IB5, HD-137, IB37, IB13 e IB36 con S.M. de 1.2, 1.2, 1.6 y 2.0 larvas/repetición respectivamente. Las cepas restantes (IB9, IB23, IB26, IB50, IB79 e IB156) no mostraron toxicidad significativa, por lo que permitieron que las larvas desarrollaran una talla normal ( $0.93 \text{ cm} \pm 0.04 \text{ cm}$ ) similar a del control ( $0.90 \text{ cm} \pm 0.05 \text{ cm}$ ) después de siete días (apéndice I, tabla 7). Sin embargo, con las cepas tóxicas las larvas sobrevivientes mostraron un crecimiento restringido y en la mayoría de los casos la talla alcanzada ( $0.66 \text{ cm} \pm 0.07 \text{ cm}$ ) fue menor que la obtenida en el control.

La concentración letal media ( $CL_{50}$ ) de las mezclas esporas-cristales de las cepas IB5, IB10, IB13, IB16, IB36, IB37, HD-1 y HD-137 se muestran en la tabla 8 del apéndice 1. La  $CL_{50}$  promedio más baja fue para la cepa HD-137 seguida, en orden de importancia, por las cepas IB10, IB37, IB16, IB5, IB36, HD-1 e IB13. No observamos una relación clara entre la talla alcanzada por las larvas después de haber sido expuestas durante siete días a las toxinas producidas por las diferentes cepas de *E. thuringiensis* en los experimentos para determinar la  $CL_{50}$ . Sin embargo, la disminución del tamaño de las larvas con respecto a la talla de las larvas del control es apreciable en el experimento de concentraciones únicas.

La prueba preliminar para determinar el rango de acción de las mezclas esporas-cristales de *B. thuringiensis* no se realizó con *S. exigua*. La mortalidad obtenida con las concentraciones probadas fue satisfactoria, aunque no fue posible obtener las  $CL_{50}$  por no poder continuar con la cría de esta especie. Sin embargo, el porcentaje de sobrevivencia en las larvas después de siete días para la cepa IB16 a una concentración de 100 ng/cm<sup>2</sup>, fue de 40 %, para las cepas IB10 e IB5 fue de 28 %, para la cepa IB13 fue de 13 % y para las cepas IB36, IB37, HD-1 y HD-137 no hubo sobrevivencia a esta concentración. La talla alcanzada por las larvas sobrevivientes a los siete días fue comparativamente menor con respecto a la talla del control (apéndice 1, tabla 9).

**PRUEBAS DE DESARROLLO DE RESISTENCIA Y PUPACION EN *S. frugiperda*.** En bioensayos preliminares con las cepas HD-137 y GM-10, las  $CL_{50}$  establecidas fueron de 174.34 y > 2000 ng/cm<sup>2</sup> respectivamente, por lo que en los experimentos para desarrollo de resistencia y pupación decidimos trabajar con

concentraciones muy por debajo de las  $CL_{50}$  obtenidas para estas cepas. Sesenta larvas de primer estadio de *S. fruqiperda* fueron alimentadas con una mezcla esporas-cristales de la cepa GM-10. La primera generación se alimentó con 20  $ng/cm^2$ , logrando un 100 % de pupación. Sin embargo, de 60 pupas obtenidas solamente emergieron 47 adultos (78.3%). En la siguiente generación, de 60 larvas de primer estadio (provenientes de huevos ovipositados por adultos de la primera generación) alimentadas con 30  $ng/cm^2$ , el 62 % ( $n=37$ ) alcanzó el estado de pupa de las cuales emergieron 32 adultos (53.3%). En la tercera generación, las larvas se alimentaron con 40  $ng/cm^2$  obteniéndose solamente el 10 % de pupación ( $n=6$ ), de donde solo emergieron dos adultos (3.3%). Dado que ambos adultos eran machos, no fue posible obtener oviposición alguna, de modo que el experimento no pudo llevarse adelante (apéndice 1, tabla 10).

En el caso de la cepa HD-137, de 60 larvas de primer estadio de la primera generación alimentadas con 20  $ng/cm^2$  de la mezcla esporas-cristales, obtuvimos 58% de pupación ( $n=35$ ), de donde emergieron 26 adultos (43.3%). De 60 larvas de la segunda generación alimentadas con 30  $ng/cm^2$  de la mezcla, solamente se obtuvieron 22 pupas (37%) de las que emergieron 20 adultos (33.3%). En la tercera generación, la pupación fue del 43 % ( $n=26$ ), de donde emergieron 16 adultos (26.6%) que ovipositaron una pequeña masa de aproximadamente 50 huevos que resultaron completamente infértiles (apéndice 1, tabla 10). En contraste, como puede observarse en la tabla 10 del apéndice 1, las larvas del control tardaron 13 días en promedio para desarrollarse con un 100 % de pupación y un 100% de emergencia de adultos fértiles. En cuanto al tiempo de desarrollo, en larvas alimentadas con las cepas GM-10 y HD-137 (20, 30 y 40  $ng/cm^2$ ) se aprecia un drástico aumento en el número de días que tarda el estado larval, pues se requiere aproximadamente

el doble de tiempo o más (de 0.38 a 1.39 veces más) para que las larvas alcancen el estado de pupa en comparación con las larvas que no fueron expuestas a la toxina que tardaron 13 días en promedio en el estado de larva (apéndice 1, tablas 10 y 11). En otro experimento enfocado a evaluar posibles alteraciones fisiológicas como excreción y pupación en larvas de *S. frugiperda*, 60 larvas de primer estadio se alimentaron en cada caso con concentraciones subletales (50 y 100 ng/cm<sup>2</sup>) de las cepas GM-10 y HD-137 y no encontramos cambios significativos en la textura, color u olor en el excremento producido a lo largo de su desarrollo con ninguna de las dos cepas probadas, pues no fue posible cuantificar la cantidad producida de excremento, por lo que no fue posible saber si la cantidad de excremento disminuye como lo reporta Frankenhuyzen (1991). Al considerar la talla máxima promedio de las larvas y el tiempo que tardan para alcanzar el estado de pupa (apéndice 1, tabla 11), observamos que a una concentración de 50 ng/cm<sup>2</sup> de la mezcla esporas-cristales de la cepa GM-10, el periodo larval se extiende hasta por 24 días, en tanto la talla promedio alcanzada fue de 1.36 cm. Con la cepa HD-137, el periodo larval fue de 23 días con una talla promedio de 1.55 cm. En el control observamos que a los 13 días las larvas alcanzan su máxima talla promedio de 3.16 cm. Del mismo modo, el porcentaje de pupación disminuye de un 100% en el control hasta 55% y 50% en larvas alimentadas con 50 ng/cm<sup>2</sup> de la mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137, respectivamente. Cuando empleamos 100 ng/cm<sup>2</sup> de ambas cepas, con la GM-10 las larvas murieron al cabo de 14 días y alcanzaron una talla promedio de 0.85 cm en tanto que con la HD-137 la talla máxima fue de 1.15 cm y todas las larvas murieron hasta los 26 días. Con ninguna de las dos cepas empleadas a 100 ng/cm<sup>2</sup> hubo formación de pupas (apéndice 1, tabla 11). Frankenhuyzen (1991) observó un comportamiento similar en larvas de

*Choristoneura fumiferana* al ser alimentadas con la toxina CryIA(b) de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*.

## DISCUSION

Este estudio muestra que mezclas esporas-cristales de algunas cepas nativas de *B. thuringiensis* tuvieron actividad significativa contra dos especies importantes de noctuidos, *S. frugiperda* y *S. exigua*. Elegimos como modelo experimental éstas especies de insectos por la importancia que tienen como plagas agrícolas, causantes de graves pérdidas económicas en maíz, tomate, berenjena e, inclusive, plantas ornamentales (Morón 1988). Todas las cepas usadas en éste trabajo, fueron aisladas de suelos agrícolas (en uso, ya cosechados o abandonados) y de vegetación natural del Estado de Morelos (México).

De las 12 cepas usadas (ver sección de métodos), seis de ellas (IB5, IB10, IB13, IB16, IB36, IB37) resultaron tóxicas contra *S. frugiperda* en un rango de 200 a 400 ng/cm<sup>2</sup>. Aún cuando las  $\delta$ -endotoxinas puras de *B. thuringiensis* se han probado en bioensayos para determinar actividad y rango de toxicidad (Aranda et al. 1994), al parecer la mezcla esporas-cristales constituye la forma común de presentación en aplicaciones prácticas, incluyendo productos comerciales (Feitelson 1990, Ware 1991, Beegle y Yamamoto 1992, Starnes et al. 1993). Hernández (1988), por ejemplo, empleando a *S. frugiperda* como organismo blanco, probó el complejo esporas-cristales de 52 cepas de *B. thuringiensis* de la colección del Instituto Pasteur. Hernández reporta una mortalidad hasta del 90% en larvas de primer estadio en 29 de las cepas probadas, empleando 100  $\mu$ l de diluciones 1/10 de una suspensión conteniendo  $3 \times 10^8$  células/ml. Para evaluar la toxicidad de las cepas nativas en todos los experimentos hemos usado larvas de primer estadio lo cual nos ha permitido obtener respuestas homogéneas gracias a la ausencia de condicionamiento que suele presentarse en estadios tardíos (Borembaum 1986).



Las ventajas de usar larvas de primer estadio son ampliamente discutidas en varios trabajos de toxicidad de preparaciones de *B. thuringiensis* (Kalfon y de Barjac 1985, Navon y Klein 1990, Teakle et al. 1992), en los cuales se concluye que las larvas de primer estadio proveen una respuesta concentración/mortalidad efectiva a diferencia de larvas de estadios avanzados. Aún cuando en los modelos explicativos del modo de acción de las toxinas de *B. thuringiensis* en las microvellosidades de las células epiteliales del intestino medio del insecto las esporas no juegan un papel preponderante (Gill et al. 1992), si es posible encontrar cierto tipo de sinergismo entre la espora y el cristal (Miyasono et al. 1994). Aquí es importante recalcar que aún cuando el espectro insecticida de las diferentes cepas de *B. thuringiensis* está determinado por el tipo de genes que porta y de cómo se expresan in vivo, este pensamiento tendrá que sufrir modificaciones en algunas especies de insectos (como *S. frugiperda*) cuando se tome en cuenta el papel de la espora y el posible sinergismo entre espora-cristal (Miyasono et al. 1994) y toxina-toxina (Mielne et al. 1990, Tabashnik 1992). En el presente trabajo no podemos concluir si existe sinergismo pues no se hicieron experimentos en ausencia de esporas en ninguna de las cepas. El bioensayo de las  $\delta$ -endotoxinas empleando larvas de especies susceptibles de lepidópteros para definir especificidad y toxicidad, requiere de técnicas en las que podamos conocer tanto la concentración aplicada como la respuesta subsecuente. La concentración verdadera solo la conoceremos al alimentar directamente a las larvas vía oral y la respuesta que esperamos puede ser variable. Tratándose de mortalidad (como respuesta esperada), enfrentamos las dificultades ocasionadas por los diferentes tipos de larvas (Heimpel y Angus 1959) (como *S. frugiperda* y *S. exigua* ubicados como insectos tipo II, susceptibles

solamente a cristales), pues se sabe que algunos tipos de larvas requieren, por fuerza, la presencia de esporas para una respuesta de mortalidad (Milne et al. 1990, Miyasono et al. 1994). En este trabajo, las mezclas esporas-cristales fueron aplicadas sobre la superficie de la dieta de modo que es difícil establecer cuánto puede comer cada larva especialmente si son de primer estadio; sin embargo, en experimentos realizados con larvas de periodos tardios (cuarto estadio temprano de *Heliothis virescens*), si es posible calcular cuanta toxina son capaces de ingerir dado que los recipientes conteniendo la dieta pueden pesarse cada cierto tiempo y ser comparadas con el control (Gould et al. 1991). En un experimento similar con *S. litura*, las concentraciones de toxina de *B. thuringiensis* se expresaron en mg/larva, ofreciendo la mezcla esporas-cristales de tal forma (cantidad limitada de dieta) que garantizara que las larvas de tercer estadio pudieran ingerir toda la toxina ofrecida (Whitlock et al. 1991). En este trabajo, los autores observaron hasta un 70% de mortalidad (n=500) cuando la concentración era de 0.6 mg/larva del aislado K-2074 (sin embargo, cristales purificados del mismo aislado a 0.07 mg/larva produjeron hasta un 94% de mortalidad). Dado que algunas plagas de insectos han tenido la habilidad de adaptarse genéticamente a las  $\delta$ -endotoxinas de *B. thuringiensis* (McGaughey y Beeman 1988, Whalon y McGaughey 1993), en este trabajo analizamos de manera preliminar la posibilidad de que *S. frugiperda* pudiese adaptarse a concentraciones crecientes de esporas-cristales de dos cepas cuya toxicidad era marcadamente diferente. La cepa GM-10 contiene el gene que expresa para la toxina *CryIAb* cuya toxicidad es baja para *S. frugiperda* (>2000 ng/cm<sup>2</sup>, Atanda et al. 1994).

Sin embargo la cepa HD-137 que contiene a los genes que expresan para *CryIAa*, *CryIB*, *CryIC* y *CryID*, resulta aproximadamente 12 veces más tóxica. No fué posible establecer posibles adaptaciones de *S. frugiperda* a las toxinas producidas por estas cepas debido a que cada concentración solamente se usó

posible establecer posibles adaptaciones de *S. frugiperda* a las toxinas producidas por estas cepas debido a que cada concentración solamente se usó durante una generación y que el número de individuos de la muestra fué relativamente bajo (n=60). Whalon y McGaughey (1993) recomiendan que al menos en pruebas de resistencia en laboratorio se debe iniciar con una muestra grande de individuos (alrededor de 2 millones) obtenidos de diferentes poblaciones con el fin de obtener la mayor variabilidad genética. Los niveles de concentración de la toxina se deben ajustar de tal forma que produzcan un alto porcentaje de mortalidad en la muestra (>70-95%), se debe usar una toxina de *B. thuringiensis* única, además de que los individuos de la muestra deben ser sanos y vigorosos. No obstante, si pudimos observar alteraciones importantes en el desarrollo y fertilidad de este lepidóptero al usar concentraciones subletales de la mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137. Resultados similares en cuanto a desarrollo y fertilidad se han observado en otros nóctuidos como *S. litura* (Whitlock et al. 1991). Suspensiones celulares de cepas de *B. thuringiensis* aisladas de cultivos de cacahuete y huertos de guayaba, redujeron el peso larval promedio hasta 15 veces el del control empleando concentraciones de 0.5 y 0.6 mg/larva después de 5 días. Sin embargo, el peso de las pupas no fué significativamente diferente en el control y en las tratadas. En otro caso similar, el nóctuido *Heliothis virescens* tuvo una reducción notable en peso larval a los diez días con respecto al control de hasta 184 veces, cuando las larvas se alimentaron con 20 µg/ml de dipel 2X (Gould y Anderson 1991). Alford y Holmes (1986) al probar el efecto de concentraciones subletales de *B. thuringiensis* (12.5 a 100 UI/ml incorporadas a la dieta) en *Choristoneura fumiferana* (Lepidóptera:Tortricidae) observaron una extensión en el tiempo de desarrollo pero además las hembras presentaron una gran variabilidad en la oviposición y aunque el número promedio de huevos no muestra gran diferencia con respecto al

control, por lo que se puede pensar que no se ve afectada la capacidad reproductiva de los organismos, si sería importante saber si la total emergencia de nuevos individuos de esos huevos se mantiene semejante a la del control.

## CONCLUSIONES Y EXPECTATIVAS

1. En este trabajo encontramos cepas nativas de *E. thalassiensis* con potencial para controlar a *S. frugiperda* y *S. exigua*. La  $CL_{50}$  de las cepas potenciales varió entre 200 y 400 ng/cm<sup>2</sup> para *S. frugiperda*. Para *S. exigua* no se calculó la  $CL_{50}$  pero la mortalidad fue total para larvas de primer estadio cuando se emplearon 100 ng/cm<sup>2</sup>.

2. Aunque la toxicidad de algunas de las cepas como la GM-10 se consideró como baja a causa de la mortalidad mínima observada en *S. frugiperda*, si observamos daños fisiológicos relacionados con el crecimiento, desarrollo y la pupación en esta especie de insecto. Es importante tomar en cuenta este hecho, ya que las estrategias de control de insectos plaga deben estar encaminadas a un manejo de las poblaciones más que al exterminio total.

3. Aunque algunas de las cepas nativas no mostraron efecto contra las especies de insectos usados en esta investigación, es posible que otros insectos blanco sean susceptibles por lo que es necesario intensificar la práctica de bioensayos con otras especies de plagas.

4. Aunque no observamos un efecto directo en la pupación en *S. frugiperda*, las larvas requirieron más tiempo para completar su desarrollo lo cual, en el campo, puede dar oportunidad a los enemigos naturales de esta especie para actuar y ejercer el control basado en la relación interespecífica propia de las dos especies.

5. Aun cuando la población tratada con concentraciones subletales de *B. thuringiensis* no mostró resistencia, sí es posible observar un efecto en el desarrollo de los insectos y en su sobrevivencia en los estadios posteriores.

La búsqueda de alternativas para el control de plagas que ofrezcan seguridad no solo al hombre como agricultor o como consumidor sino también para las especies que habitan en los diferentes agroecosistemas, está encaminada no a que desaparezca la población plaga totalmente, sino mantenerla en niveles que sean económicamente sustentables. Entre las alternativas más prósperas están los insecticidas microbiales, destacando las preparaciones a base de *B. thuringiensis*. Sin embargo, las actuales desventajas que aún presentan estos formulados pueden ser salvadas con la búsqueda de nuevas y mejores cepas que puedan ofrecer no sólo especificidad y toxicidad a una especie determinada, sino que permitan hacer combinaciones de varias toxinas o de mezclas toxina-esporas y su complementación con otras estrategias (culturales, físicas, legales e incluso químicas) con el objeto de evitar el desarrollo de resistencia al producto, ya que no es justificable el gasto económico que implica la investigación y regulación de cualquier producto antes de salir al mercado, para que en pocos años no tenga utilidad.

Los ecosistemas de las regiones intertropicales, como México, ofrecen una amplia variedad de especies benéficas y plagas por lo que es de esperar que en éstas áreas se encuentre también una gran diversidad de cepas de *B. thuringiensis* con nuevos espectros de organismos susceptibles y de toxicidad.

APENDICE 1
------------

Tabla 3. Efecto de la mezcla esporas-cristales de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en la sobrevivencia de larvas de primer estadio de *S. frugiperda*. La concentración empleada fue de 200 ng/cm<sup>2</sup>. Se anexa cuadro de análisis de varianza.

Tratam.	agua	5	9	10	13	16	23	26	36	37	50	79	156	HD-1	HD-157	
Repet.																
1	4	4	4	3	4	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	2
2	4	4	4	3	4	4	4	4	2	3	3	4	4	4	4	2
3	4	4	4	3	4	4	4	4	3	3	3	4	4	3	4	2
4	4	4	4	3	4	4	4	4	1	4	3	4	4	3	4	2
5	4	4	4	3	4	4	4	4	3	4	4	3	4	3	4	2
Total	20	20	20	15	20	20	20	20	17	13	17	19	20	17	10	

CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA

F.V.	G.L.	S.S.	C.M.	F.cal.	F.tab.
Tratam.	14	21.68	1.548	16.64	0.05 1.84
Error	60	5.60	0.093		0.01 2.35
Total	74	27.28			





Tabla 5. Efecto de la mezcla esporas-cristales de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en la sobrevivencia de larvas de primer estadio de *S. frugiperda*. La concentración empleada fue de 2000 ng/cm<sup>2</sup>. Se anexa cuadro de análisis de varianza.

tratam.	agua	5	9	10	13	16	21	26	36	37	50	79	156	HD-1	HD-177
Repet.															
1	4	1	4	1	2	1	4	4	2	1	4	4	4	1	1
2	4	1	4	0	1	1	4	3	2	1	4	4	4	0	2
3	4	2	4	1	1	1	4	4	3	1	3	4	3	0	1
4	4	1	4	0	2	1	4	4	2	2	4	4	4	0	1
5	4	1	4	0	2	0	4	4	2	1	4	4	4	0	1
Total	20	6	20	2	8	4	20	19	10	6	19	20	19	1	6

CUADRO DE ANALISIS DE VARIANZA

F.V.	G.L.	S.S.	C.M.	F.cal	F.tab.
Tratam.	14	163.20	11.64	103.0	0.05 1.84
Error	60	6.80	0.113		0.01 2.35
Total	74	170.00			



Tabla 7. Efecto de la mezcla esperas críticas de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en la sobrevivencia y talla de larvas de primer estadio de *S. trugiperda* Smith.

Cepa	Mortalidad*		Talla de sobrevivientes**	
	200	2000	200	2000
5	0	14	0.78	0.78
9	0	0	0.85	0.95
10	5	18	0.86	0.60
13	0	12	1.0	0.62
16	0	16	0.99	0.68
23	0	0	0.84	0.88
26	0	1	0.90	0.91
36	3	10	0.44	0.64
37	2	14	0.85	0.65
50	3	1	0.97	0.90
79	1	0	1.15	0.96
156	0	1	0.83	0.99
HD-1	3	19	0.81	0.55
HD-137	10	14	0.77	0.74

\* Concentración expresada en nanogramos por centímetro cuadrado de superficie de dieta (ng/cm<sup>2</sup>).

\*\*Talla promedio expresada en centímetros (cm) después de 7 días de bioensayo. La desviación estandar no excedió un valor de 0.33 en todos los casos. En todos los ensayos se emplearon 20 larvas por cada cepa y concentración.

Tabla 8. Concentración letal media (CL<sub>50</sub>) de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* probadas contra larvas de primer estadio de *S. frugiperda*. La CL<sub>50</sub> está expresada en nanogramos por centímetro cuadrado de superficie de dieta (ng/cm<sup>2</sup>).

<u>Repetición</u> Tratamiento	CL <sub>50</sub> 1	CL <sub>50</sub> 2	CL <sub>50</sub> promedio
5	193.19	380.5	286.845
10	193.98	265.49	229.735
13	345.23	446.75	395.99
16	136.6	364.9	250.75
36	222.52	405.59	314.055
37	106.07	394.7	250.385
HD-1	294.2	345.3	319.75
HD-137	205.9	142.79	174.345

Los números después de la CL<sub>50</sub> representan los experimentos llevados a cabo.

Tabla 9. Supervivencia de larvas de primer estadio de *Spodoptera exigua* alimentadas con cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* mezcla esporas-cristales a una concentración de 100 ng/cm<sup>2</sup> superficie de dieta.

Cepa Núm.	larvas usadas	Núm. larvas sobrevivientes	talla promedio en cm.
5	24	6	0.51
13	24	7	0.58
16	24	13	0.60
36	24	10	0.45
37	24	0	-
HD-1	24	0	-
HD-137	24	0	-
Control	24	22	0.76

Tabla 10. Efecto de la mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137 de *Bacillus thuringiensis* en el desarrollo de *S. frugiperda* al evaluar el posible desarrollo de resistencia.

Concent. en ng/cm <sup>2</sup>	GM-10			HD-137		
	tiempo larval (días)	% de pupación	% de emergencia de adultos	tiempo larval (días)	% de pupación	% de emergencia de adultos
20	18	100.0	78.3	22	58.0	43.3
30	29	61.6	53.3	28	35.0	31.6
40	31	10.0	3.3	29	43.3	26.6
Control	13	100.0	100.0			

Después de la tercera generación, los adultos ovipositaron pero ya no hubo eclosión de los huevos.

Tabla 11. Efecto de concentraciones subletales de mezcla esporas-cristales de las cepas GM-10 y HD-137 de *Bacillus thuringiensis* en el desarrollo larvario y pupación de *S. frugiperda*.

Concent. en ng/cm <sup>2</sup>	GM-10			HD-137		
	tiempo larval (días)	talla max. promedio en cm	% de pupación	tiempo larval (días)	talla max. promedio en cm	% de pupación
100	14	0.85	0	26	1.15	0
50	24	1.36	55	23	1.55	50
control	13	3.16	100			

## APENDICE II

## METODOLOGIA PARA BIOENSAYOS

INGREDIENTES DE LA DIETA.- harina de soya 71.1 gr., germen de trigo 31.7 gr., sales Wesson 10.6 gr., sacarosa 13 gr., acido sorbico 1 gr., methylparaben 1.6 gr., acido ascorbico 4.3 gr., agar 14 gr., acido acético (25%) 12 ml., formalina (10%) 4.4 ml., cloruro de colina (15%) 7.3 ml., solución vitamínica 3.5 ml., aureomicina (14%) 1.2 ml..

PREPARACION DE LA DIETA.- En un recipiente de un litro se disuelve el agar en 500 ml de agua destilada caliente y se agita para evitar que se formen grumos. La solución de agar se hierve a fuego bajo durante unos 10 minutos más. Esta solución de agar junto con los demás ingredientes, excepto las vitaminas, se licúan y al mismo tiempo se agregan 600 ml más de agua destilada fría. Por último se agrega la solución vitamínica. Inmediatamente la dieta se pone en un vaso de precipitado pequeño y se vacían 2 ml. aproximadamente por pozo de la dieta en placas Corning cell wells de 24 pozos evitando que se formen burbujas. Las cajas se secan a temperatura ambiente en una superficie plana. Una vez que la dieta haya secado se procede a colocar la solución de la toxina a probar agitando suavemente la placa para que se impregne toda la superficie de la dieta en los pozos, se deja secar a temperatura ambiente o bien en una campana de extracción.

ORGANISMOS DE PRUEBA.- De preferencia se utilizan larvas de primer estadio las cuales se toman suavemente con un pincel fino y se colocan una por una en los pozos de la placa lo más rápido posible para evitar que escapen; una vez llena la placa se enrolla en papel plástico (Envolpack) el cual se estira para que se adhiera a la abertura de los pozos, se hace una pequeña perforación en cada pozo y por último se coloca la tapa de la placa rellena con bajo alfombra y se sujeta bien con ligas. Siete días después se procede a revisar las placas anotando el número de larvas muertas y vivas. De ser posible, se mide la talla de las larvas sobrevivientes.

## APENDICE III

Método de obtención de copas nativas de *B. thuringiensis* a partir de suelos. Muestras de 200 g de suelos agrícolas y de vegetación natural del Estado de Morelos se usaron para el screening de copas nativas de *B. thuringiensis*. El aislamiento de las copas se realizó según la técnica empleada en la compañía belga Plant Genetic Systems, aprovechando la resistencia que presentan las esporas de *B. thuringiensis* a las altas temperaturas y a su incapacidad de germinar en presencia de acetato de sodio. Una muestra de 0.5 g de suelo fue inoculada en 10 ml de caldo luria (LB) (para 1000 ml: triptona 40 g, extracto de levadura 20 g, NaCl 40 g) al que se adicionan 10 ml de acetato de sodio 0.25 M, pH 6.8. Posteriormente, las muestras se incuban durante 4 hr a 30°C en condiciones de agitación. Después de la incubación, se toma una alícuota de 2 ml y se incuba a 60°C por 1 hr. Pasado este tiempo, se toman dos alícuotas de 0.5 ml de las que una se almacena en glicerol al 50% y a -20°C, en tanto que con la otra se preparan diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-4}$  en una solución amortiguadora a base de fosfatos 0.05M, pH 6.8 más 150 mM de NaCl (PBS). Para permitir la germinación de las esporas de *B. thuringiensis*, las diluciones se siembran en medio de cultivo T3 sólido (triptona 30 g, triptosa 20 g, extracto de levadura 15 g, agar 150 g disuelto en 1000 ml de PBS) y posteriormente se incubaron a 26°C. Las cepas de *B. thuringiensis* se identificaron por su morfología colonial macroscópica (colonias muy blancas y de morfología estrellada), tomando la cepa de *B. thuringiensis* HD-1 como control positivo para facilitar las observaciones. Aquellas cepas con aspecto semejante a *B. thuringiensis* se transfirieron a medio LB sólido incubándose a 29°C hasta obtener una esporulación completa. Finalmente, se preparan frotis de las colonias esporuladas, se tifen con cristal violeta y se observan al microscopio óptico. Los cristales adoptan el color violeta en tanto que las esporas se observan refringentes. Las colonias crecidas en medio LB en cajas petri se recuperaron levantando la colonia con la ayuda de una espátula y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada. Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 en agua destilada para cuantificar la cantidad de proteína total (mg/ml) (esporas y cristales) presente en las muestras utilizando el método Lowry.

## APENDICE III

Método de obtención de cepas nativas de *B. thuringiensis* a partir de suelos. Muestras de 200 g de suelos agrícolas y de vegetación natural del Estado de Morelos se usaron para el screening de cepas nativas de *B. thuringiensis*. El aislamiento de las cepas se realizó según la técnica empleada en la compañía belga Plant Genetic Systems, aprovechando la resistencia que presentan las esporas de *B. thuringiensis* a las altas temperaturas y a su incapacidad de germinar en presencia de acetato de sodio. Una muestra de 0.5 g de suelo fue inoculada en 10 ml de caldo luria (LB) (para 1000 ml: triptona 40 g, extracto de levadura 20 g, NaCl 40 g) al que se adicionan 10 ml de acetato de sodio 0.25 M, pH 6.8. Posteriormente, las muestras se incuban durante 4 hr a 30°C en condiciones de agitación. Después de la incubación, se toma una alícuota de 2 ml y se incuba a 60°C por 1 hr. Pasado este tiempo, se toman dos alícuotas de 0.5 ml de las que una se almacena en glicerol al 50% y a -20°C, en tanto que con la otra se preparan diluciones desde  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en una solución amortiguadora a base de fosfatos 0.05M, pH 6.8 más 150 mM de NaCl (PBS). Para permitir la germinación de las esporas de *B. thuringiensis*, las diluciones se siembran en medio de cultivo T3 sólido (triptona 30 g, triptosa 20 g, extracto de levadura 15 g, agar 150 g disuelto en 1000 ml de PBS) y posteriormente se incubaron a 26°C. Las cepas de *B. thuringiensis* se identificaron por su morfología colonial macroscópica (colonias muy blancas y de morfología estrellada), tomando la cepa de *B. thuringiensis* HD-1 como control positivo para facilitar las observaciones. Aquellas cepas con aspecto semejante a *B. thuringiensis* se transfirieron a medio LB sólido incubándose a 29°C hasta obtener una esporulación completa. Finalmente, se preparan frotis de las colonias esporuladas, se tifen con cristal violeta y se observan al microscopio óptico. Los cristales adoptan el color violeta en tanto que las esporas se observan refringentes. Las colonias crecidas en medio LB en cajas petri se recuperaron levantando la colonia con la ayuda de una espátula y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada. Posteriormente se hicieron diluciones 1:10 en agua destilada para cuantificar la cantidad de proteína total (mg/ml) (esporas y cristales) presente en las muestras utilizando el método Lowry.



## LITERATURA CITADA

- Abarca, C., J. Cerón y R. Quintero. 1991. ¿Que son los bioinsecticidas?. *Universidad, Ciencia y tecnología* 1:19-26. Universidad Autónoma del Edo. de Morelos.
- Abarca, C., A. Martínez, M. Caro y R. Quintero. 1992. Optimización del proceso de fermentación para producir *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai*. *Universidad: Ciencia y tecnología* 2:51-56. Universidad Autónoma del Edo. de Morelos.
- Alford, A. y J. Holmes. 1986. Sublethal effects of carbaryl, aminocarb, fenitrothion, and *Bacillus thuringiensis* on the development and fecundity of the Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae). *Journal of Economic Entomology*. 79:31-34.
- Aranda, E., J. Sánchez, R. Quintero y A. Bravo. 1993. Unión *in vitro* de delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* a cortes de tejido intestinal de áfidos. I Reunión de la Sociedad Mexicana de Biología celular. 14-16 de junio de 1993, México D.F. U.N.A.M.
- Aranda, E., L. Lina, G. Peña, J. Sánchez, A. Bravo y R. Quintero. 1994. Hacia la búsqueda de nuevos bioinsecticidas: análisis de la unión *in vitro* de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* al epitelio intestinal medio de insectos plaga. Concurso "Premio anual Casa de la Ciencia", Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Mor.
- Aranson, A., B. William y P. Dunn. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. *Microbiological Review* 50:1-24.
- Aranson, A. y D. Wu. 1990. Specificity *in vivo* and *in vitro* of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins active on Lepidoptera. *En: New directions in biological control: Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases*, ed. Alan R. Liss. 547-559.
- Bauer, S. y H. Pankratz. 1992. Ultrastructural effects of *Bacillus thuringiensis* var. San Diego on midgut cells of the cottonwood leaf beetle. *Journal of Invertebrate Pathology* 60:15-25.
- Benchtel, D. y L. Bulla. 1976. Electron microscope study of sporulation y parasporal crystal formation in *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Bacteriology* 127:1472-1481.
- Beegle, C. y T. Yamamoto. 1992. Invitation paper (C.P. Alexander Fund): History of *Bacillus thuringiensis* Berliner research and development. *The Canadian Entomologist* 124:587-616.
- Berenbaum, M. 1986. Postingestive effects of phytochemicals on insects: On Paracelsus and Plant Products. *En: Insects-Plants Interactions*. J. Miller y T. Miller, Eds Springer-Verlag. 121-153.
- Bravo, A., S. Jansens, M. Peferoen. 1992a. Inmunocytochemical localization of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in intoxicated insects. *Journal of Invertebrate Pathology* 60:237-246

Bravo, A., S. Jansens, M. Peferoen. 1992b. Immunocytochemical analysis of specific binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins to lepidopteran and coleopteran midgut membranes. **Journal of Invertebrate Pathology** 60:247-253.

Bulla, L., K. Kramer, L. Davidson. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Bacteriology** 130:375-383.

Bulla, L., K. Kramer. 1981. Purification and characterization of the entomocidal protoxin of *Bacillus thuringiensis*. **The Journal of Biological Chemistry** 256:3000-3004.

Burgess, H. D. 1981. Safety, safety testing and quality control of microbial pesticides. *En: Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*. Ed. H. D. Burgess. Academic Press. 737-767.

Cantwell, G., W. Cantello. 1984. Effectiveness of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in controlling a sciarid fly, *Lycoriella mali*, in mushroom compost. **Journal of Economic Entomology** 77:473-475.

Carpenter, J. y B. Wiseman. 1992. *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) development and damage potential as affected by inherited sterility and host-plant resistance. **Environmental Entomology**. 21:57-60.

Catálogo Oficial de Plaguicidas. 1991. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. SARI-SEDUE

Chauvin, 1967. La fauna del suelo. *En: Artrópodos*, tomo II. Publicación de la Facultad de Ciencias. U.N.A.M.

Coulson, R. y J. Witter. 1990. Entomología Forestal. Ecología y Control. 1ª edición. ed. Limusa.

Crook, N. y P. Jarrett. 1991. Viral and bacterial pathogens of insects. **Journal of Applied Bacteriology**, Symposium Supplement 70:915-965

Drummond, J., D. Miller y D. Pinnock. 1992. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* against *Damalima ovis* (Phthiraptera: Mallophaga) **Journal of Invertebrate Pathology**. 60:102-103.

Dubois, N., R. Reardon y D. Kolodny-Hirsch. 1988. Field efficacy of the NRD-122 strain of *Bacillus thuringiensis* against gypsy moth (Lepidoptera: Lymantridae). **Journal of Economic Entomology**. 81:1672-1677.

Dulmage, H. 1981. Insecticidal activity of isolates of *Bacillus thuringiensis* and their potential for pest control. *En: Progress in the Microbial Control of Pest and Plant Diseases, 1970-1980*, Ed. H. D. Burgess, 191-220. London: Academic Press.

Equihua, M. y S. Anaya. 1990. Estados inmaduros de los insectos. Colegio de posgraduados, Centro de Entomología y Acarología.

Hernández, J. y A. Aranda. 1981. Las bacterias entomopatógenas y el control biológico de plagas. *En: Temas Selectos de Fitopatología Vegetal*. P.H.M.C. 101-128.

East, P. 1981. The crystal toxin of *Bacillus thuringiensis*. *En: Progress in the Microbial Control of Pests and Plant Diseases*, 1970-1980, Ed. H. D. Burgess, London: Academic Press.

Feitelson, J., P. Quirk y E. Goertner. 1971. Alternatives Hosts for *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxina genes. *En: New Directions in Biological Control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Ed. Alan R. Liss, Inc. New York. 561-591.

Feitelson, J., J. Payne y L. Kim. 1991. *Bacillus thuringiensis*: Insects and beyond. *Biotechnology* 10:271-275.

Ferré, J., M. Real, J. Van Rie, S. Jansens y M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U.S.A.* 88:5119-5123.

Ferre, D. 1993. Potential for resistance to *Bacillus thuringiensis*: Colorado potato beetle (Coleoptera: Chrysomelidae) a model system. *American Entomologist* 39:38-44.

Finney, D. 1962. "Probit analysis" Cambridge University Press, Cambridge.

Fischhoff, P., E. Bowdish, E. Ferlak, F. Martone, S. McCormick, J. Niedermeyer, D. Deran, K. Kusano-Kretzmer, E. Mayer, D. Rochester, S. Rogers y R. Fraley. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 5:807-813.

Fuxa, 1990. New directions for insect control with baculoviruses. *En: New Directions in Biological Control : Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Ed. Alan R. Liss, Inc. New York. 97-114.

Galán, W. 1990. Apuntes del departamento de microbiología e inmunobiología. Tema: Control Biológico. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Autónoma de Nuevo León.

Gelernter, W. 1992. Application of biotechnology for improvement of *Bacillus thuringiensis* and their use for control of lepidopteran pests in the Caribbean. *Florida Entomologist* 75:484--493.

Gill, S., E. Cowles y V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Entomologist* 37:615-636.

Goldburg, R. y G. Tjaden. 1990. Are BTE plants really safe to eat?. *Biotechnology* 8:1011-1015.

Gould, F., A. Anderson, D. Landis, H. Van Mellaert. 1991. Feeding behavior and growth of *Heliothis virescens* larvae on diets containing *Bacillus thuringiensis* formulations or endotoxins. *Entomologist Experimental Applied* 58:199-210

- Gaál, F. y A. Anderson. 1991. Effects of *Bacillus thuringiensis* and *Spinosad* on growth, behavior, and fitness of susceptible and resistant strains of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae). **Environmental Entomology** 20: 30-38.
- Holmpeil, A. y T. Angus. 1959. The site of action of crystalliferous bacteria in lepidoptera larvae. **Journal Insect Pathology** 1:14-31
- Hernandez, J. 1988. Evaluation de la toxicité de *Bacillus thuringiensis* sur *Spodoptera frugiperda*. **Entomophaga** 33:163-171.
- Henry, J. 1990. Control of insects by protozoa. *En: New Directions in Biological Control. Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. Eds. Ralph R. Baker y Peter E. Dunn 161-176
- Höfte, H. y H. Whitely. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Microbiological Reviews** 53:242-255
- Höfte, H., P. Soetaert, S. Jansens y M. Peferoen. 1990. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of a new Lepidoptera-specific crystal protein gene from *Bacillus thuringiensis*. **Nucleic Acid Research** 18: 5545-5545.
- Ibarra, R. 1992. Biología y aplicación de las bacterias entomopatógenas. II Curso de Control Biológico, Memorias, Sociedad Mexicana de Control Biológico. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan-UNAM. Edo de México.
- Indrasith, L., N. Suzuki, K. Ogiwara, S. Asano y H. Hori. 1992. Activated insecticidal crystal proteins from *Bacillus thuringiensis* serovars killed adult house flies. **Letters in Applied Microbiology** 14:174-177.
- Infante, G. y A. Calderón. 1980. Manual de Analisis Probit. Colegio de Posgraduados. Chapingo, Mexico. 107 pp.
- Jones, D., V. Karunakaran, H. Burges y A. Hacking. 1991. Ultra-violet resistant mutants of *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Bacteriology** 70:460-463.
- Kalfon, A. y H. de Barjac. 1985. Screening of the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against the egyptian cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. **Entomophaga** 30:177-186
- Karamandileu, G., A. Lambropoulos, S. Koliadis, P. Manousis, D. Ellar y C. Kastritsis. 1991. Toxicity of *Bacillus thuringiensis* to laboratory populations of the olive fruit fly (*Dacus oleae*). **Applied and Environmental Microbiology**. 57:2277-2282
- Kaya, H. 1990. Entomopathogenic nematodes in biological control of insects. *En: New Directions in Biological Control. Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases*. R. Baker y P. Dunn., Eds. Alan R. Liss, Inc. New York. 189-196.
- Keppel, G. 1982. Design and Analysis: A Researcher's Handbook. Prentice-Hall, Inc. New Jersey. 669pp.

Lambert, H. y M. DeBorcen. 1990. Insecticidal proteins of *Bacillus thuringiensis*. **Bioscience** 42:112-122.

Lockwood, J., T. Sparks y R. Storey. 1984. Evolution of insect resistance to insecticides: a reevaluation of the roles of physiology and behavior. **Bulletin of the Entomological Society of American** 30:41-51.

Mahlojwala, J., W. Chaudhary y R. Tawget. 1988. Toxic and morphological effects of *Parilia tomentosa* ssp. *parviflora* (natural form of the oriental rat flea *Xiphomyia sturrocki* sp. n.). **Journal Economic of Entomology** 8:1606-1601.

Mallis, M. y M. Ravensberg. 1991. The Biology of plants, trees and their natural enemies. Knowing and recognizing. Report of Institute of Plant, Netherlands.

Marbens, W., H. John, G. Bonee, E. Eubank, J. Van Bent, F. Vireer y J. Vlak. 1990. Insecticidal activity of a bacterial crystal protein expressed by a recombinant baculovirus in insect cells. **Applied and Environmental Microbiology** 56:2764-2770.

McCoy, C. 1990. Entomogenous fungus microbial pesticides. **New Directions in Biological Control. Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases.** Ralph E. Baker y Peter E. Dunn, Eds. Alan R. Liss, New York. 139-160.

McDonald, E., L. Kok y A. Yeusten. 1990. Response of fourth instar *Pieris rapae* parasitized by the braconid *Microgaster robusta* to *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki*  $\delta$ -endotoxin. **Journal of Invertebrate Pathology** 56:422-423.

McGaughey, W. H., E. W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of the indian meal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). **Journal of Economic Entomology** 81:18-22.

McGaughey, W. H. 1990. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin. **New Directions in Biological Control. Alternatives for Suppressing Agricultural Pests and Diseases.** R. Baker y P. Dunn, Eds. Alan R. Liss, Inc. New York. 583-598.

McGuire, M., B. Shasha, L. Lewis, R. Barlett y K. Kinney. 1990. Field evaluation of granular starch formulations of *Bacillus thuringiensis* against *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera:Pyralidae). **Journal of Economic Entomology.** 83:2207-2210.

Mihn, J. 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva de infestacion de insectos, en la selección de plantas hospedantes para resistencia al gusano de la mazorca eletero *Heliothis zea*. Centro Internacional para el Mejoramiento del Maiz y Trigo. Folleto técnico, 17pp.

Milne, R., A. Ge, D. Rivers y D. Dean. 1990. Specificity of insecticidal crystal proteins. **Analytical Chemistry of Bacillus thuringiensis.** 22-35.

Miyaseno, M., S. Inagaki, M. Yamamoto, K. Ohba, T. Ishiguro, R. Takeda, y Hayashi. 1994. Enhancement of delta-endotoxin activity by toxin-free spore

of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella xylostella*. **Journal of Invertebrate Pathology** 63:111-112.

Melloy, P. 1992. Impact of the black fly (Diptera:Simuliidae) control agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on chironomid (Diptera:Chironomidae) and other nontarget insects: results of ten field trials. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 8:24-31

Moran, M., R. A. Terren. 1928. Entomología Práctica. Instituto de Ecología. UNAM. 592 pp.

Mycogen 1991. Method for biological control of maize rootworm larvae and alfalfa weevil using new *Bacillus thuringiensis* biological control agent expressing crystal protein. Mycogen/EP-05-77104. **Derwent Biotechnology Abstracts**. 11:59.

Nayon, A., M. Klein y S. Baum. 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera litoralis* larvae based on standardized diets. **Journal of Invertebrate Pathology**. 55:387-393

Nirva, C., M. Stelzer y R. Beckwith. 1983. Effects of *Bacillus thuringiensis* on parasites of western Spruce Budworm (Lepidoptera:Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**. 80:750-753.

Ohba, M., H. Iwahana, S. Asano, S. Susuki, E. Sato y H. Hori. 1992. A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* with a high larvicidal activity specific for scarabaeid beetles. **Letters in Applied Microbiology**. 14:54-57

Ortiz, A. 1992. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del Estado de Morelos. Tesis para obtener el grado de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 67pp.

Ortiz A., M. Ortiz, A. Bravo y R. Quintero. 1992. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del Estado de Morelos. **Universidad: Ciencia y tecnología** 2:45-50.

Osborne, L., D. Boveias y R. Lindquist. 1985. Activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on *Bradysia coprophila* (Diptera:Sciaridae). **Journal Economic Entomology**. 78:922-925

Payne, J. y R. Cannon. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling pest in the family Aphididae. United States Patent: No.5,262,159.

Pereyra, A. 1992. Clonación, caracterización y manipulación del gen que codifica para la delta-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10. Tesis para Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.

Romero, N. J. 1989. Control Biológico de Plagas en el Suelo. II mesa redonda sobre plagas del suelo. Chapingo, Mexico.

Rupar, M., W. Donovan, G. Groat, A. Slaney, D. Mattinson, T. Johnson, J. Charles, V. Cosmao y H. de Barjac. 1991. Two novel strains of *Bacillus*

of *Bacillus thuringiensis* against the diamondback moth, *Plutella maculipennis*. **Journal of Invertebrate Pathology** 63:111-113.

Molloy, F. 1992. Impact of the black fly (Diptera:Simuliidae) control agent *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on chironomid (Diptera:Chironomidae) and other nontarget insects: results of ten field trials. **Journal of the American Mosquito Control Association**. 8:34-31

Moren, M., R. A. Terrien. 1998. *Entomología Práctica*. Instituto de Ecología. UNAN. 502 pp.

Mycogen 1992. Method for biological control of maize rootworm larvae and alfalfa weevil using new *Bacillus thuringiensis* Biological control agent expressing crystal protein. Mycogen/EP-US-715184. **Derwent Biotechnology Abstracts**, 11:59.

Navon, A., M. Klein y S. Baum. 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera litoralis* larvae based on standardized diets. **Journal of Invertebrate Pathology**. 55:387-393

Nirva, C., M. Stelzer y R. Beckwith. 1987. Effects of *Bacillus thuringiensis* on parasites of western Spruce Budworm (Lepidoptera: Tortricidae). **Journal of Economic Entomology**. 80:750-753.

Ohba, M., H. Iwahana, S. Asano, S. Suzuki, R. Sato y H. Hori. 1992. A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high latitudinal activity specific for scarabid Beetles. **Letters in Applied Microbiology**. 14:54-57

Ortiz, A. 1992. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del Estado de Morelos. Tesis para obtener el grado de licenciatura. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 67pp.

Ortiz A., M. Ortiz, A. Bravo y E. Quintero. 1992. Aislamiento y caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del Estado de Morelos. **Universidad: Ciencia y tecnología** 2:45-50.

Osborne, L., D. Boveias y R. Lindquist. 1985. Activity of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis on *Bradysia coprophila* (Diptera:Sciariidae). **Journal Economic Entomology**. 78:922-925

Payne, J. y R. Cannon. 1993. Use of *Bacillus thuringiensis* isolates for controlling pest in the family Aphididae. United States Patent: No.5262159.

Pereyra, A. 1992. Clonación, caracterización y manipulación del gen que codifica para la delta-ondotoxina de *Bacillus thuringiensis* cepas GM-7 y GM-10. Tesis para Doctor en Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.

Romero, N. J. 1989. Control Biológico de Plagas en el Suelo. II mesa redonda sobre plagas del suelo. Chapingo, México.

Rupar, M., W. Donovan, G. Groat, A. Slaney, J. Mattinson, I. Johnson, J. Charles, V. Cosmao y H. de Barjac. 1991. Two novel strains of *Bacillus*

*thuringiensis* toxic to coleopterans. **Applied and Environmental Microbiology**. 57:3337-3344.

Sharp, V. 1979. *Statistics for the Social Sciences*. Little, Brown and Company, Boston. 381pp.

Sawicki, P. 1979. *Resistencia de Insectos a Insecticidas*. Span 27(2) Shell Co.

Sebesta, F., J. Karkas y E. Horska. 1981. Thuringiensin, the Beta exotoxin of *Bacillus thuringiensis*. En: *Progress in the Microbial Control of Pests and Plant Diseases 1970-1980*, ed. H. D. Burgess, Academic Press. 249-281.

Singh, F. 1977. *Artificial Diets for Insects, Mites and Spiders*. Plenum Publishing Co., New York 594pp.

Starnes, R., C. Liu y F. Marrone. 1993. History, use and future of microbial insecticides. **American Entomologist** 39:83-91.

**Technology Impact Reports #t031. Biopesticides**. Frost and Sullivan editors, summer 1990.

Tabashnik, B. 1992. Evaluation of synergism among *Bacillus thuringiensis* toxins. **Applied and Environmental Microbiology**. 58:3343-3346.

Teakle, R., G. Caon, J. Grimshaw y V. Byrne. 1992. Larvicidal activity of strains of *Bacillus thuringiensis* for *Helicoverpa armigera* (Hübner) and *Helicoverpa punctigera* Wallengren (Lepidoptera: Noctuidae) using a droplet-feeding method. **Journal Australian Entomology Society** 31:209-213.

Terra, W. 1990. Evolution of digestive systems of insects. **Annual Review Entomology**. 35:181-200.

Valenzuela, C. 1990. *Persistencia de Bacillus Thuringiensis var. kurstaki sobre brócoli (Brassica oleracea var. italica) en el área de Montecillo, México*. Tesis para obtener el grado de maestro. Chapingo, México.

Van Frankenhuyzen, K. y J. Gringorten. 1991. Frass failure and pupation failure as quantal measurements of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidoptera. **Journal of Invertebrate Pathology** 58:465-467.

Van Rie, J. 1992. *The role of membrane binding of Bacillus thuringiensis Berliner insecticidal crystal proteins in specificity and resistance*. Tesis doctoral. Universiteit Gent ; Faculteit Vah De Landbouw Wetenschappen.

Ward, E. y D. Ellar. 1987. Nucleotide sequence of a *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* gene coding 130 kDa delta-endotoxin. **Nucleic Acids Research** 15:7195-7195

Whalon, M. y W. McGaughey. 1993. *Insects resistance to Bacillus thuringiensis*. En: *Advanced Engineered Pesticides*. Leo Kim Ed. New York. 430p

Ware, G. 1991. *Fundamental of pesticides. A Self Instruction Guide*. 3<sup>a</sup> ed. Ed. Thomson Publications. 307pp.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Whitlock, V., M. Lo, M. Kuo y T. Soong. 1991. The new isolate of *Bacillus thuringiensis* pathogenic to *Spodoptera litura*. **Journal of Invertebrate Pathology**. 58:33-39.