



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD TOXICA DE
CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* EN GALLINAS
CIEGAS (COLEOPTERA: MELOLONTHIDAE) DE
IMPORTANCIA AGRICOLA.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

ANGEL ALONSO ROMERO LOPEZ



DIRECTOR DE TESIS:
DR FRANCISCO JAVIER VILLALOBOS HERNANDEZ

2001



FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

MAT. MARGARITA ELVIRA CHÁVEZ CANO
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Evaluación de la actividad tóxica de cepas de Bacillus thuringiensis
en gallinas ciegas (Coleoptera: Melolonthidae) de importancia agrícola.

realizado por Angel Alonso Romero López

con número de cuenta 9354937-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Francisco Javier Villalobos Hernández

Propietario

Dra. María Eugenia Núñez Valdéz

Propietario

Dr. José Guadalupe Palacios Vargas

Suplente

M. en C. Rosa María Ramírez Gama

Suplente

M. en C. María Guadalupe Tsuzuki Reyes

FACULTAD DE CIENCIAS
U. N. A. M.

Consejo Departamental de Biología

Edna María Suárez Díaz

Dra. Edna María Suárez Díaz



**DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA**

292316

AGRADECIMIENTOS

Vaya un genuino agradecimiento a todos aquellos que dieron forma y relieve a este humilde esfuerzo.

En primer término y en todo lo alto, agradezco profundamente al Creador, quien me permite día con día ser parte de su extraordinaria obra y me da la oportunidad de aspirar a ser uno de sus hijos predilectos...

Un agradecimiento muy especial a mis padres, por ser un ejemplo de honestidad y nobleza; por su amor, su paciencia y comprensión. Por brindarme su apoyo incondicionalmente, pero sobre todo, por darme la vida... A mis hermanos, por ser mis mayores y más duros críticos y por ser mi fuerza constante de aliento para continuar superándome.

Deseo hacer patente también mi sincero agradecimiento al Dr. Francisco Javier Villalobos H., director de la presente tesis, por su enorme apoyo en mi formación profesional y personal. Por un lado, enriqueciendo el manuscrito de la tesis con sus valiosas sugerencias, además de compartir gran parte de sus conocimientos, lo cual me ha ayudado a descubrir mi verdadera vocación: la entomología. Por otro lado, en el aspecto humano, sus consejos le han dado el cauce adecuado a mi desbocada energía y a mi impaciencia, además de impulsarme en momentos de extrema desilusión. Agradezco así mismo, la confianza que ha depositado en mí persona, y por supuesto, su legado máximo de promover la fe y la paciencia hacia una vida más feliz y sustentable... Gracias Doc...

A la Dra. María Eugenia Núñez Valdéz, por su valiosa aportación a este trabajo en el área de biología molecular y su participación en el diseño experimental de los bioensayos de infección; además, por ser parte del jurado revisor y dedicarle gran parte de su tiempo a la revisión del escrito de la tesis, la cual se enriqueció con sus observaciones y sugerencias.

Al Ing. Agrónomo Marco A. Barreda, quien aportó valiosa información a esta tesis, en especial en lo referente al aislamiento de proteínas y por facilitarme la micrografía de *Bacillus thuringiensis* (Figura 1).

A la UNAM, por la oportunidad de prepararme tanto física como mentalmente durante el transcurso de mi carrera, y por permitirme ser parte de la familia universitaria.

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT-UNAM), por su inagotable actividad científica, y por brindarme todo lo necesario para desarrollar esta tesis en sus instalaciones. En especial a la Dra. Alejandra Bravo de la Parra, quien facilitó amablemente el espacio físico y el material del Laboratorio de Microbiología Molecular, del cual es responsable; así mismo, al I.Q. Jalil Saab, Jefe de Docencia y Formación de Recursos Humanos, que me permitió sin restricción alguna el uso del equipo de cómputo y de la Biblioteca y a Maribel Velasco, por todo lo anterior y por su amena compañía.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por apoyarme como tesista becado.

Al Centro Nacional de Referencia en Roedores, Aves y Malezas de la SAGAR (CNRRAM-SAGAR), especialmente al M. en C. José Gustavo Torres M., por facilitar sus instalaciones y equipo de cómputo, que resultaron de enorme valía para la terminación de esta tesis.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), por abrirme sus puertas y apoyarme en mi formación profesional. En especial, al M. en C. Ignacio Delgado, académico de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de esta casa de estudios, por su valiosa aportación a este trabajo en el área de estadística.

A las M. en C. Rosa María Ramírez Gama, a la M. en C. María Guadalupe Tsuzuki R. y al Dr. José Guadalupe Palacios Vargas, quienes formaron parte del jurado revisor. Reconocimiento especial por su amabilidad y enorme disposición para la lectura del manuscrito de esta tesis, enriqueciéndola con sus observaciones y sugerencias. Gracias por interesarse en mi trabajo.

A mis amigos: Alyn Palacios, Marsdenia Chavelas, Gabriela Juárez, Moisés Rubio, Guillermo Téllez, Mario Pinto y Humberto Salas, por su invaluable amistad y por alentarme a no morir en el intento. En este sentido, un infinito agradecimiento al "Master Moy" por sus inquebrantables muestras de amistad y lealtad en todos estos años. Sus palabras de aliento y apoyo en momentos difíciles han sido parte preponderante en mi desarrollo como profesionista y como ser humano. Gracias, mi hermano...

Por último, un agradecimiento de todo corazón para Dolores Quintana Jiménez, mi amiga y compañera sentimental, por continuar a mi lado, por alentarme continuamente a luchar por mis ideales, y muy especialmente, por su amor y comprensión. Gracias por todo, amor...

A todos, GRACIAS...

INDICE GENERAL

	página
I. RESUMEN	5
II. INTRODUCCIÓN	6
II.A. Antecedentes	7
II.1. Control biológico de plagas	7
II.2. <i>Bt</i> como sistema modelo de biocontrol	8
1. Esquema de clasificación actual de las delta-endotoxinas	9
2. Estructura y actividad tóxica de las delta-endotoxinas	11
3. Importancia de la biología molecular en el descubrimiento de nuevos genes <i>cry</i> (aporte de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa)	14
II.3. Biosistemática de la familia Melolonthidae	15
1. Esquema de clasificación general	15
2. Distribución y diversidad	17
3. Hábitos alimenticios	17
4. Ciclo biológico	18
5. Ecología y daños a la agricultura	21
II.4. <i>Bt</i> y su viabilidad en el manejo sustentable de la gallina ciega	22
III. HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS	24
IV. OBJETIVOS	24
V. METODOLOGÍA	25
V.1. Obtención y manejo del material biológico para los bioensayos	25
1. Obtención del material de <i>Bt</i>	25
1.1. Obtención del DNA de las cepas bacterianas para su uso como templado en la PCR	25
1.2. Condiciones de PCR y electroforesis en gel de agarosa para la identificación de genes <i>cry8</i>	27
1.3. Oligos generales y específicos para identificar genes <i>cry8</i>	28
1.4. Estimación de tamaños y pesos moleculares de productos PCR	29
2. Cría y mantenimiento de larvas de Melolonthidae	29
2.1. Colecta de escarabajos adultos	29
2.2. Cultivo y cría de larvas en el laboratorio	29
2.3. Colecta de larvas en el campo	30
2.4. Acondicionamiento y mantenimiento de larvas en el laboratorio	30
3. Selección de larvas para los bioensayos	30
V.2. Bioensayos: características y condiciones	31
1. Bioensayo I	31
2. Bioensayo II	32
3. Bioensayo III	32
4. Condiciones generales de los bioensayos	33
V.3. Análisis Estadístico de datos	34
VI. RESULTADOS	35
VI.1. Selección de cepas de <i>Bt</i>	35
1. Cepas para bioensayos I y II	35
2. Cepas para bioensayo III	40

VI.2. Obtención de larvas de Melolonthidae	41
1. Larvas de primero y segundo estadios	41
2. Larvas de tercer estadio	41
VI.3. Bioensayo I	43
1. Mortalidad	43
2. Índice de morbi-mortalidad	43
3. Anorexia	46
VI.4. Bioensayo II	46
1. Mortalidad	46
2. Índice de morbi-mortalidad	48
3. Anorexia	48
VI.5. Bioensayo III	51
1. Mortalidad	51
2. Índice de morbi-mortalidad	55
3. Anorexia	58
4. CL_{50}	61
VII. DISCUSIÓN	62
VII.1. Bioensayos	62
1. <i>Mortalidad</i>	62
2. <i>Índice de morbi-mortalidad y anorexia</i>	65
3. <i>Análisis CL_{50}</i>	68
VII.2. Cría y mantenimiento de larvas de Melolonthidae, en condiciones de laboratorio	68
VII.3. Perspectivas del uso de <i>Bt</i> en el manejo sustentable de la gallina ciega	70
VIII. CONCLUSIONES	72
IX. REFERENCIAS	74
APÉNDICE	81
A. Preparación de soluciones y medios de cultivo	81
B. Anexo informativo	82
B.1. Importancia de los entomopatógenos y entomófagos en el manejo de plagas	82
1. Virus y baculovirus	83
2. Rickettsias	84
3. Bacterias	84
4. Hongos	85
5. Protozoarios	85
6. Nemátodos	86
7. Insectos entomófagos	86
8. Entomopatógenos y entomófagos potenciales de la gallina ciega en México	91
B.2. El bioensayo: propiedades e importancia en la investigación científica	96
1. La relación dosis-respuesta en un bioensayo	96
2. Importancia del bioensayo en el desarrollo de resistencia de un Insecto	97
3. Factores que afectan los resultados del bioensayo	98
B.3. Sustentabilidad y la búsqueda de una agricultura sustentable	100
1. Definición y principios	100
2. Recursos biológicos	101
3. La materia orgánica como herramienta de sustentabilidad	101
4. La agricultura convencional y la sustentable: aspectos económicos y ambientales	102

INDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRÁFICAS

FIGURAS

	página
Figura 1. Micrografía en microscopio electrónico de <i>Bacillus thuringiensis</i> , en la cual se detalla su estructura espora:cristal	10
Figura 2. Estructura tridimensional de las toxinas <i>cry3A</i> y <i>cry1Aa</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> , mostrando la conformación de los dominios I, II y III	12
Figura 3. Representación esquemática de las variantes del ciclo biológico de dos especies de Melolonthidae	20
Figura 4. Metodología utilizada en el presente estudio	26
Figura 5. Esquema general de un análisis por PCR sencillo y PCR múltiple, con oligos generales y específicos diseñados para reconocer genes <i>cry8A</i> , <i>cry8B</i> y <i>cry8C</i>	36
Figura 6. Amplificación por PCR de fragmentos de genes <i>cry8</i> , de las cepas IB184 e IB324 de <i>Bt</i> , en gel de agarosa al 2%	37
Figura 7. Amplificación por PCR de fragmentos de genes <i>cry8</i> , de las cepas IB205 e IB477 de <i>Bt</i> , en gel de agarosa al 2%	38
Figura 8. Comparación de la apariencia corporal externa de larvas de <i>Ph. trichodes</i> del lote Control respecto a larvas infectadas con la cepa IB209 (1:7) de <i>Bacillus thuringiensis</i> , a una concentración de 10,000 ng/ml (c1). Resultados de Morbi-mortalidad a los 30 días del bioensayo III	57

CUADROS

Cuadro 1. Clasificación general de la familia Melolonthidae en México	16
Cuadro 2. Productos PCR generados a partir de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> , con oligos dirigidos a genes <i>cry8</i>	39
Cuadro 3. Número de larvas de primer estadio, obtenidas y recuperadas a partir del cultivo de adultos de las diferentes especies de Melolonthidae que fueron colectadas en Cuernavaca, Morelos	42
Cuadro 4. Resultados obtenidos en cada rubro de evaluación, al probar las cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> en distintas concentraciones, en contra de larvas de tercer estadio de <i>Ph. trichodes</i> después de 30 días del bioensayo III.	52
Cuadro 5. Listado general de microorganismos entomopatógenos y entomófagos utilizados para el manejo de coleópteros de Melolonthidae y Scarabacidae, a nivel mundial	87-90
Cuadro 6. Listado de microorganismos con potencial como entomopatógenos y entomófagos de coleópteros Melolonthidae en México	92-95

GRÁFICAS

VI.3. Bioensayo I	
Gráficas 1 y 2. Mortalidad	44
Gráficas 3 y 4. Morbi-mortalidad	45
Gráfica 5. Anorexia	45

	página
VI.4. Bioensayo II	
Gráficas 6, 7 y 8. Mortalidad	47
Gráficas 9, 10 y 11. Morbi-mortalidad	49
Gráficas 12, 13 y 14. Anorexia	50
VI.5. Bioensayo III	
Gráficas 15, 16, 17 y 18. Mortalidad	53-54
Gráficas 19, 20, 21 y 22. Morbi-mortalidad	56-57
Gráficas 23, 24, 25 y 26. Anorexia	59-60
Gráfica 27. CL ₅₀	61

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

c1	concentración 1 (10,000 ng de proteína por ml de agar)
c2	concentración 2 (1,000 ng de proteína por ml de agar)
c3	concentración 3 (100 ng de proteína por ml de agar)
c4	concentración 4 (10 ng de proteína por ml de agar)
c5	concentración 5 (1 ng de proteína por ml de agar)
°C	grados centígrados
cm	centímetros
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	trifosfatos desoxirribonucleósidos
EDTA	tetra acetato disodio de etilendiamina
ELISA	inmunoensayo de reconocimiento enzimático
gr	gramos
ha	hectárea
hrs.	horas
kDa	kilodaltons
LB	medio Luria Bertani
lt.	litros
m.	metros
µg	microgramos
MgCl ₂	Cloruro de Magnesio
min.	minutos
µl	microlitros
ml.	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
Mod.	modelo
ng	nanogramos
No.	número
pb	pares de bases
rpm	revoluciones por minuto
sobreviv. enf.	sobrevivientes enfermas
seg	segundos
síntom.	síntomas
TAE	buffer para electroforesis Tris-Acetatos / EDTA
TE	buffer Tris-EDTA
ton	tonelada
V.	volts

I. RESUMEN

Las larvas de escarabajos (Coleoptera:Melolonthidae) conocidas comúnmente como "gallinas ciegas", se han convertido en los últimos años en una plaga de importancia económica en varios cultivos, entre los que destaca el maíz. El problema se ha intentado contrarrestar mediante el uso de agroquímicos, lo que ha resultado una solución limitada. Es por esa razón que el control biológico de plagas adquiere una especial relevancia. Uno de los ejemplos más contundentes del control biológico es el de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), una bacteria gram positiva que produce cristales proteicos (delta-endotoxinas o proteínas Cry) con actividad tóxica específica para diferentes órdenes de insectos, entre ellos los del Orden Coleoptera. El presente estudio se enfocó a la detección y evaluación de la actividad tóxica de cepas de *Bt* con potencial para el manejo de escarabajos Melolonthidae.

Se realizaron tres bioensayos de infección en condiciones de laboratorio utilizando larvas de tres especies de gallina ciega: *Anomala inconstans* de primer y tercer estadio, *Phyllophaga ravidata* de primero y segundo estadio y *Phyllophaga trichodes* de tercer estadio, las cuales fueron aisladas y alimentadas con fragmentos pequeños de zanahoria o agar impregnados con las diferentes cepas de *Bt* probadas. Se evaluó la toxicidad de 7 cepas de *Bt*: IB184, IB205, IB324 e IB477 en los bioensayos I y II, IB209, IB293 y KB92 (*Buibui*) en el bioensayo III. Como testigo positivo se utilizó la cepa *Buibui* y como testigo negativo se utilizó zanahoria o agar libre de bacteria. Las 6 primeras cepas forman parte de una colección perteneciente al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (IBT-UNAM), mientras que la cepa *Buibui* es originaria del Japón, donde ha sido aislada y evaluada con resultados promisorios.

Para la realización de los bioensayos se consideraron diferentes parámetros de toxicidad para su evaluación: mortalidad, anorexia y morbi-mortalidad. En el tercer bioensayo, además, se determinó la Concentración Letal 50 (CL₅₀) de las cepas probadas. En los primeros dos bioensayos, la cepa IB477 resultó la de mayor efectividad en la mayoría de los parámetros de evaluación, en contra de todas las especies de gallina ciega utilizadas. Le siguieron en actividad tóxica las cepas IB205 e IB184 y sólo la cepa IB324 presentó inocuidad en este sentido. Al determinar la CL₅₀ en el bioensayo III, se observó que la cepa IB209 en sus dos mezclas espora:cristal (1:7 y 1:1) presentó la mayor actividad tóxica del grupo de cepas nativas evaluadas en este bioensayo, en contra de larvas de *Phyllophaga trichodes* de tercer estadio (valores CL₅₀ de 1.59 y 2.02 µg/ml, respectivamente). A pesar de ello, al comparar estos valores con el de la cepa KB92, utilizada como control en el mismo, se observaron aún diferencias en la toxicidad (valor CL₅₀ de 0.09 µg/ml).

El análisis con la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) sugirió que todas las cepas de *Bt* seleccionadas para realizar los bioensayos, y en especial IB477, IB205, IB209, IB293 y KB92, son portadoras de genes del tipo *cry8C*, que han mostrado ser activos en contra de larvas de Melolonthidae. Además estas cepas cuentan con otros genes *cry* desconocidos que sugieren la existencia de genes *cry8* nuevos, los cuales pueden ser activos contra larvas de Melolonthidae.

En el presente estudio se discute como utilizando *Bt*, el control biológico puede ser adoptado dentro del paradigma de la agricultura sustentable.

II. INTRODUCCION

Los escarabajos de la familia Melolonthidae (Coleoptera) representan un serio problema económico al convertirse en plagas (sobre todo en la etapa de larvas cuando son conocidas como "gallina ciega" o "nixticuil"), de los principales cultivos del país como son el maíz, trigo, sorgo, frijol, caña de azúcar, entre otros (Morón, 1984). Después de los lepidópteros, las larvas de Melolonthidae representan un 2° lugar en importancia como plagas del maíz (Villalobos, 1992). Esta familia está representada por 520 especies cuyos estados larvales se presentan en el suelo y pertenecen a 13 géneros (Morón, 1984). En México, es el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) donde la gallina ciega provoca el daño más importante. Las pérdidas ocasionadas por gallinas ciegas del género *Phyllophaga* en los cultivos de maíz en México varían de 0.4-1.3 ton / ha / año. Los mayores estragos se presentan en 10 estados centrales, lo que representa aproximadamente el 50% de la superficie dedicada al maíz (Villalobos, 1992).

La agricultura moderna utiliza una gran variedad de insecticidas para el control de plagas de insectos, y la gran mayoría se sintetizan químicamente. A pesar de que se ha reducido significativamente el daño causado por algunas plagas con un uso intensivo de insecticidas, no se ha obtenido una reducción global de las pérdidas del cultivo atribuidas a plagas. En Estados Unidos, las pérdidas causadas por insectos en cultivos se han elevado del 7% al 14% del rendimiento en el periodo de 1945 a 1990, a pesar de que se ha incrementado el uso de agroquímicos (Villalobos, 1995). Recientemente se ha retomado la importancia y viabilidad del control biológico, y se ha emprendido la búsqueda de variedades vegetales resistentes, además de aprovechar la enorme gama de posibilidades que ofrece la biología molecular (Núñez-Valdéz, 1993). El microorganismo más utilizado a la fecha como instrumento de control biológico de insectos plaga es la bacteria *Bacillus thuringiensis* (*Bt*), que con base en su estructura espora-cristal de características insecticidas (delta-endotoxinas) atrae la atención del mundo de la investigación. Para la clasificación de grandes colecciones de cepas de *Bt*, la técnica PCR ha demostrado ser la más versátil, rápida y eficiente (Bravo et al., 1996).

En nuestro país se han iniciado estudios en este sentido, pero se requiere profundizar en aspectos clave de la toxicidad causada por este microorganismo en particular. Existen pocos reportes del uso de *Bt* para el control de melolontidos en México. En 1992, Arredondo reportó la presencia de cristales de *Bt* en adultos enfermos de los Melolonthidae *Macrodactylus nigripes* Bates y *M. murinus* Bates respectivamente, en agroecosistemas de Tlaxcala y Jalisco (Villalobos com. pers.). Sin embargo, hasta el momento no se han demostrado los postulados de Koch para este microorganismo. Es por ello que se requiere evaluar la toxicidad de éstas cepas contra melolontidos, así como desarrollar bioensayos confiables que permitan evaluar la actividad patogénica de dichas cepas. El presente estudio se aboca a esta tarea.

II.A. Antecedentes

II.1. Control biológico de plagas

En la década de 1950, el control biológico constituía una entidad completa y suficiente, que se podía definir con facilidad y diferenciar de otros métodos de control de plagas de insectos. Consistía en eliminar las poblaciones de plagas mediante la utilización de las propiedades biológicas de ciertos organismos, sobre todo de los parásitos, depredadores o competidores que se oponen al desarrollo y bienestar de las especies de insectos nocivos (NAS, 1982). Sin embargo, un sinnúmero de nuevas ideas en este sentido han sido aprobadas desde entonces, pocas de las cuales se pueden incluir en cualquiera de las antiguas categorías. En vez de eso, tienden a definirse en un lugar intermedio, y por lógica, podrían incluirse en 2 o más categorías. Por lo tanto, los antiguos límites tienden a fundirse y desvanecerse, y se han desechado los juicios definitivos. Esta tendencia ha sido estimulada por la inclinación actual a usar varios tipos de control combinados, de manera que un método complementa o refuerza al otro para obtener la más completa eliminación de los insectos nocivos, con un mínimo de efectos secundarios perjudiciales (NAS, 1982).

En este sentido, el control biológico puede manejarse como la manipulación artificial de fenómenos biológicos naturales, con el propósito de reducir o controlar poblaciones nocivas de insectos, otros animales o plantas. Aquí se incluye el uso de cepas o variedades resistentes de animales o plantas desarrollados a través de programas extensos de investigación en los que se aprovechan los conocimientos actuales de genética. El término también implica la introducción, cría en masa y liberación de grandes cantidades de organismos depredadores o parásitos productores de enfermedades. Las prácticas de conservación y manejo del suelo que fomentan las poblaciones de aves insectívoras y otros animales depredadores deben de considerarse de utilidad en el control biológico (Davidson, 1992). Si bien algunos conceptos como resistencia de la planta hospedera, genética autocida o feromonas son incluidas en un programa de este tipo, no han sido aceptados como tal por lo que son comúnmente referidos como "métodos biológicos de control" (García et al., 1988 en Cate, 1990) o como "métodos de control de plagas basados biológicamente" (Youngberg y Ridway, 1988 en Cate, 1990).

Según Cate (1990), la tendencia actual para definir al control biológico es la unificación de conceptos, lo que se traduce en las siguientes prioridades:

- a) el reestablecimiento y mantenimiento de la homeostasis entre poblaciones
- b) el uso de relaciones simbióticas, las cuales se manifiestan según el nivel del organismo
- c) explotación del automantenimiento y las interacciones contra-adaptativas, las cuales pueden guiar hacia un control permanente
- d) la atención a problemas de la plaga como parte de sistemas holísticos
- e) el uso de los mayores avances científicos en tecnología

Este enfoque fomenta los mecanismos naturales de regulación y produce un ambiente desfavorable para las plagas, lo que reduce el uso de insecticidas químicos y también reduce los costos de producción en un agroecosistema.

Recientes estimaciones sugieren que en Estados Unidos, a pesar de que se utilizan 350,000 toneladas de pesticidas anualmente, aproximadamente el 37% (unos 50, 000 millones de dólares) de la producción potencial total se pierde por concepto de plagas (Villalobos, 1995).

En particular, el control biológico presenta tres ventajas importantes con respecto al control químico (National Academy of Sciences, op.cit., en Calderón, 1998):

1) Una vez establecido el control biológico de plagas es relativamente permanente. Los enemigos naturales de los que depende se perpetúan a sí mismos, y se ajustan a los cambios de población de las plagas que atacan.

2) El control biológico de plagas es parcialmente seguro al reducir efectos secundarios tales como toxicidad o contaminación del ambiente.

3) Los costos para el desarrollo de un insecticida químico se estiman en USA\$ 25 millones y para un bioinsecticida en USA \$1 millón.

El control biológico fue dejado de lado por la euforia provocada por los insecticidas químicos en los años 30's y 50's de este siglo. El uso de insecticidas químicos afectó negativamente el ambiente y los insectos desarrollaron resistencia. Estos no eran de acción específica para las plagas, matando también a insectos benéficos (Mallet, 1989 en Calderón, 1998). A pesar de que se ha reducido significativamente el daño causado por algunas plagas con un uso intensivo de insecticidas, no se ha obtenido una reducción global de las pérdidas del cultivo atribuidas a plagas y sí, en cambio, ha disminuido el número de sus enemigos naturales. Una estrategia más holística de manejo podría reducir las plagas utilizando una combinación de métodos de control en lugar de una táctica unilateral tal como el empleo de pesticidas (Villalobos, 1995).

En la actualidad, se reafirma como elemento importante en la búsqueda de un manejo sustentable de los recursos, y una nueva conciencia ecológica.

II.2. *Bt* como sistema modelo de biocontrol

Bt es una bacteria entomopatógena Gram positiva que se distingue por su capacidad de síntesis, durante el proceso de esporulación, de un cristal paraesporal formado por una o varias proteínas denominadas delta-endotoxinas o proteínas Cry (Figura 1). Su peso molecular varía entre 65 y 138 kDa y son elementos de enorme interés científico y comercial a nivel mundial fundamentalmente por sus propiedades insecticidas (Bravo et al., 1995).

Ishiwata, un investigador japonés, aisló esta bacteria a partir de un gusano de seda muerto en 1901; sin embargo, fue hasta los años cincuenta cuando se relacionó a la estructura cristalina que produce con los efectos tóxicos observados al ponerla en contacto con larvas de insectos (Lorence, 1995).

En 1911 fue aislada por Berliner a partir de larvas enfermas de la palomilla de la harina del Mediterráneo, *Anagasta kuhniella* (Zell.), y más tarde diversas variedades de la bacteria se obtuvieron a partir de diferentes especies de orugas infectadas (Cremlyn, 1990; Davidson, 1992).

Durante muchos años sólo se encontraron cepas con actividad tóxica para lepidópteros; no fue sino hasta hace poco más de 25 años que se han encontrado cepas con actividad tóxica contra una mayor diversidad de organismos (Bravo et al., 1995).

Desde hace más de 30 años, las delta-endotoxinas se utilizan comercialmente en el control de insectos, principalmente de los órdenes: Lepidoptera, Coleoptera y Diptera. Esta familia de proteínas presenta importantes ventajas para el control de insectos en comparación con los insecticidas químicos de actividad residual.

Estas proteínas son moléculas biodegradables por lo que no contaminan suelos y aguas, y además por su gran especificidad, no son tóxicas hacia plantas y animales no blanco (Bravo et al., 1996).

Las cepas de *Bt* se aíslan de muestras de suelo, agua, hojas, polvo de granos almacenados, o directamente de cadáveres de insectos infectados. El método de aislamiento consiste en la selección de esporas por medio de pasteurización (Carozzi et al., 1991; Cerón et al., 1994). Las cepas de esta bacteria se reconocen por la morfología colonial característica y por la producción de cuerpos parasporales refringentes al microscopio de contraste de fases. En México se ha logrado recopilar una colección de 2,000 cepas de *Bt*, a partir de muestras de suelo de diferentes regiones del país (Bravo et al., 1996). Actualmente existen grandes colecciones de cepas de *Bt* que han sido aisladas de todas partes del mundo.

1. Esquema de clasificación actual de las delta-endotoxinas

En 1989 se propuso un esquema de clasificación para las delta-endotoxinas o proteínas Cry, basado en su espectro de acción insecticida y su homología a nivel de su estructura primaria (Höfte y Whiteley, 1989).

El criterio para incluir a una proteína dentro de este esquema era que su secuencia presentara una similitud significativa con una ó más de las toxinas conocidas. Al conocerse nuevas secuencias de genes *cry* fueron surgiendo inconsistencias en este esquema de clasificación, ya que se comenzaron a encontrar toxinas con una alta homología con las ya conocidas, pero con un espectro de acción completamente diferente (Crickmore et al., 1998).

En 1993 un grupo de investigadores, reconocidos en el área, formaron un Comité Revisor de la Nomenclatura de las delta-endotoxinas, que forma parte del "Bacillus Genetic Stock Center", de la Universidad de Ohio, con la finalidad de actualizar el sistema de clasificación. La nueva nomenclatura se basa solamente en la similitud de las secuencias de aminoácidos. El criterio para incluir a una proteína dentro de este esquema es que su secuencia muestre una similitud significativa con una o más de las toxinas conocidas, o bien, provenga de las inclusiones proteicas producidas por *Bt* y tenga actividad pesticida u otros efectos tóxicos verificables contra un organismo blanco (Crickmore et al., 1998).

La denominación "*cry*" se conserva y a cada gen se le asigna un nombre compuesto por cuatro categorías (Crickmore et al., 1998):

En la primera los números romanos se sustituyen por números arábigos. De esta manera, la proteína conocida anteriormente como *cryIIIa* ahora con base en la nueva clasificación se denomina *cry3A*; a todo gen *cry* cuyo producto muestre una homología menor al 45% respecto de las proteínas conocidas, se le asignará un nuevo número arábigo.

La segunda categoría es una letra mayúscula. A los genes *cry* cuyo producto comparta menos del 75% pero más del 45% de homología con alguna proteína conocida se le asignará una letra mayúscula distinta.

La tercera categoría es una letra minúscula. Se le asignará a todas las proteínas que compartan menos del 95% de su secuencia, pero más del 75%.



Figura 1. Micrografía en microscopio electrónico de *Bacillus thuringiensis*, en la cual se detalla su estructura espora: cristal.
A. cristal B. espora C. esporangio

Para diferenciar a las proteínas que representan diferentes tipos de otras que varían en sólo algunos residuos, se utiliza una cuarta categoría que es un número arábigo. Se asignará a las proteínas cuya secuencia comparta menos del 100% de homología, pero más del 95% con respecto a las proteínas conocidas. A la fecha se tienen reportadas más de 124 formas diferentes de genes *cry* (Crickmore et al., 1998).

2. Estructura y actividad tóxica de las delta-endotoxinas

Un elemento de interés al estudiar las delta endotoxinas, es la determinación de sus estructuras, primaria (secuencia de aminoácidos), secundaria y terciaria (plegamiento en el espacio). Esto es porque con este conocimiento se pueden correlacionar dominios estructurales con funciones específicas de la proteína, de tal manera que haciendo uso de los métodos de la biología molecular se podrían diseñar cambios específicos de algunos aminoácidos que puedan dar lugar a proteínas más potentes o con especificidad más amplia (Bravo et al., 1995).

La estructura tridimensional determinada por difracción de rayos X de la porción tóxica de dos miembros de la familia de las delta-endotoxinas, las proteínas *cry3A* (Li et al., 1991 en Lorence, 1997) y *cryIAa* (Grochulski et al., 1995 en Lorence, 1997), ha revelado que estas moléculas globulares están estructuralmente organizadas en tres dominios (Figura 2):

El dominio I (*cry 3A*, residuos 58 al 290; *cry IAa*, residuos 33 al 253), está constituido por un ramillete de seis alfa- hélices anfipáticas que rodean a otra hélice de naturaleza hidrofóbica, la alfa-hélice 5.

El dominio II (*cry 3A*, residuos 291 al 500; *cry IAa*, residuos 265 al 461), está formado por dos alfa-hélices cortas y tres láminas-beta antiparalelas que terminan en asas ("loops") en el vértice de la molécula, formando un prisma beta (Shimizu y Morikawa, 1996 en Bravo et al., 1996).

El dominio III tiene una estructura de beta-sandwich, con una topología típica de "jelly-roll" (Bravo et al., 1996). El alineamiento y comparación de la estructura primaria de las primeras toxinas descritas (las anteriormente llamadas *cryI*, *cry II* y *cryIII*) reveló la existencia de cinco bloques o regiones de aminoácidos altamente conservados, que están separados por regiones hipervariables de diferentes longitudes (Höfte y Whiteley, 1989).

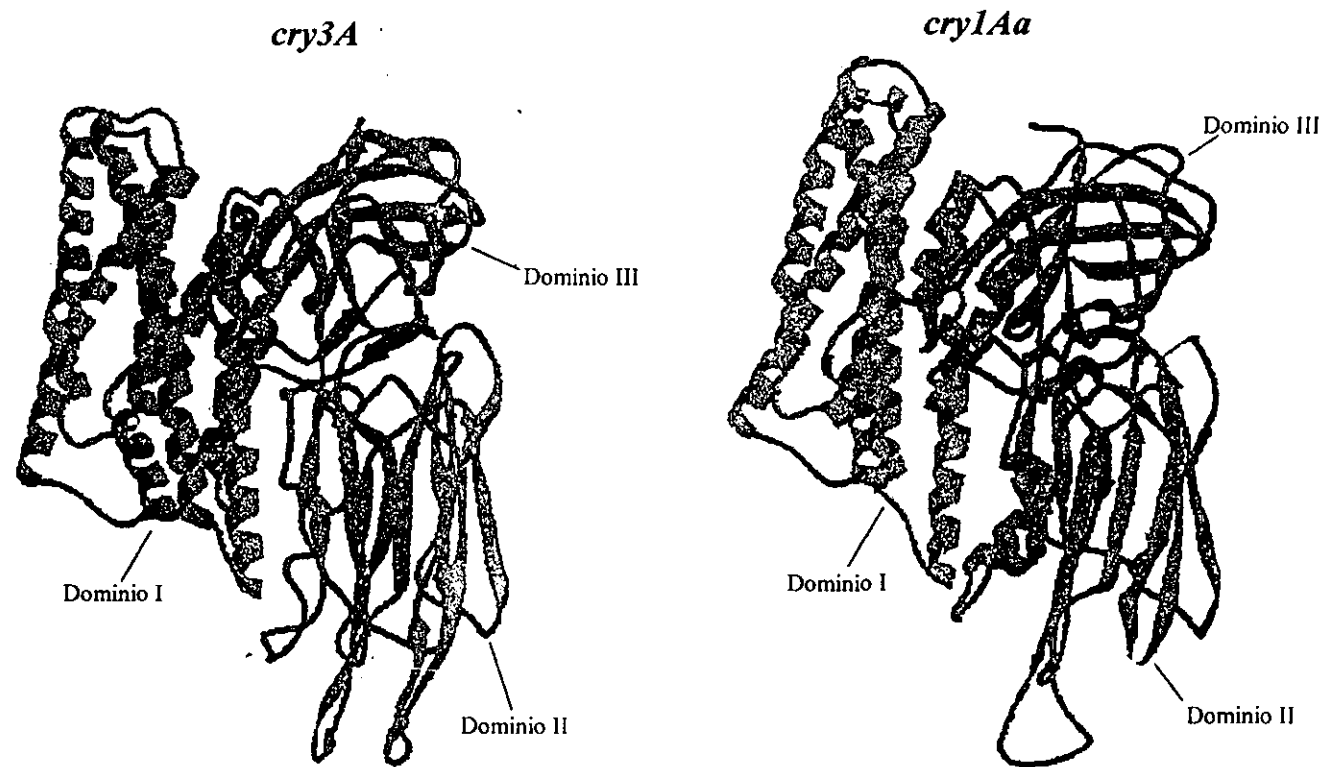


Figura 2. Estructura tridimensional de las toxinas *cry3A* y *cry1Aa* de *Bacillus thuringiensis*, mostrando la conformación de los dominios I, II y III. (tomado de Lorence, 1997)

Dichos bloques de aminoácidos conservados constituyen la parte central de la molécula ("el corazón de la toxina"), por lo que es razonable asumir que todas las toxinas *cry* poseen una conformación general similar y por lo tanto un modo de acción semejante (Li et al., 1991 en Bravo et al., 1996).

Los cristales producidos por las diversas cepas de *Bt* son insolubles, excepto a pH alcalino. El intestino medio de la mayor parte de las larvas de insectos susceptibles (lepidópteros, dípteros y algunos coleópteros) se caracteriza por su alto pH y condiciones reductoras, requerimientos indispensables para la solubilización eficiente de las inclusiones proteicas (Knowles, 1994 en Lorence, 1997).

La especificidad de las delta-endotoxinas está determinada por la unión de estas proteínas a receptores específicos que se encuentran en la superficie de las células susceptibles (Knowles & Ellar, 1986).

El modelo general de actividad propone que los dominios proteicos se encargan del reconocimiento de los receptores de membrana. Otras regiones de la misma proteína realizan la actividad tóxica, aparentemente mediante inserción de regiones hidrofóbicas en las membranas celulares, produciendo lisis osmótica. Tales dominios proteicos son, así mismo, codificados por regiones determinadas del DNA en los genes relacionados (Nuñez-Valdéz, 1993).

El mecanismo de acción de las delta-endotoxinas consta de las siguientes etapas múltiples (Lorence, 1997):

- a) solubilización del cristal
- b) procesamiento de la protoxina
- c) unión al receptor
- d) inserción a la membrana
- e) agregación
- f) formación de poros
- g) citólisis

Su actividad se manifiesta por la degradación de las células epiteliales del intestino debido a lisis osmótica de las mismas (Knowles y Ellar, 1987 en Nuñez-Valdéz, 1993). Los síntomas que se observan en las larvas del insecto blanco, cuando éstas ingieren las delta-endotoxinas son: cese de la ingesta, parálisis del intestino y tracto alimenticio, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte (VanRie, 1992). Estos efectos comienzan a observarse un minuto después de la administración de las delta-endotoxinas (Gupta et al., 1985; en Lorence, 1997). Se ha demostrado que la sensibilidad de los insectos a las proteínas Cry se debe a la presencia de sitios específicos de unión (receptores) en la microvellosidad de las células epiteliales.

Se sabe que la unión al receptor es irreversible, que es frecuente la heterogeneidad en el tipo y número de receptores del intestino medio larvario y que esto resulta en la sensibilidad a más de una toxina (Van Rie et al., 1990 en Barreda, 2000).

3. Importancia de la biología molecular en el descubrimiento de nuevos genes *cry* (aporte de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa)

De acuerdo con Núñez-Valdéz (1993), con el descubrimiento de la estructura del material genético, en 1953, se inicia el nacimiento de la biología molecular, y con ello una etapa en la historia de la biología. Desde ese momento se empiezan a acumular una serie de conocimientos que han permitido alcanzar una imagen más clara del funcionamiento de la célula viva y en especial de la estructura de su material genético. El año de 1970 marca una etapa importante: el inicio de la manipulación enzimática del material genético de los seres vivos y consecuentemente, la aparición de la ingeniería genética molecular.

Hoy en día, mediante el uso de técnicas de DNA recombinante es posible aislar fragmentos de material genético que llevan genes específicos. En los últimos 20 años, el conocimiento de la biología molecular ha avanzado a pasos agigantados. Una de las principales razones de este avance radica en el estudio a nivel molecular del material genético y en la aplicación de la tecnología del DNA recombinante. Este avance ha hecho posible la resolución de muchos problemas antes inaccesibles en todas las áreas de la biología a nivel básico y aplicado (Núñez-Valdéz, 1993).

Se han establecido diferentes estrategias para identificar genes *cry* conocidos dentro de una colección de cepas. Estos métodos incluyen desde identificación con anticuerpos hasta la identificación por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite una rápida determinación de la presencia o ausencia de una secuencia de DNA blanco. (Bourque et al., 1993; Carozzi et al., 1991; Cerón et al., 1994; Chak et al., 1994; Kalman et al., 1993). La técnica PCR es un método *in vitro* que se utiliza para amplificar exponencialmente un segmento de DNA blanco que se sitúa entre dos regiones de secuencia conocida (Figura 5). Esta técnica consiste de ciclos repetitivos de desnaturalización del templado de DNA a altas temperaturas, antecedido al alineamiento de oligonucleótidos que son utilizados como "primers" o detonadores (oligos) de una serie de reacciones sintéticas que son catalizadas por una DNA polimerasa. Estos oligos son oligonucleótidos con segmentos cortos de una hebra simple de DNA, que complementan a las regiones finales 5' de las hebras del DNA blanco; normalmente cuentan con secuencias diferentes que se complementan para unir las hebras opuestas del DNA patrón y de esta manera marcar el segmento de DNA que será amplificado (Maniatis et al., 1989). Los ciclos de desnaturalización, alineamiento y síntesis de DNA se repiten varias veces. Si anteriormente sólo era posible obtener pequeñas cantidades de un específico gene a partir de una célula, en la actualidad mediante la PCR pueden ser amplificadas alrededor de un millón de copias a partir de una copia de un solo gene, en unas pocas horas. Los productos de un ciclo de amplificación pueden utilizarse como templado para el siguiente y cada ciclo sucesivo esencialmente duplica la cantidad de productos de PCR obtenidos (Maniatis et al., 1989).

El creciente uso de *Bt* aunado al gran interés en el manejo preventivo de la resistencia a las delta-endotoxinas ha incrementado los esfuerzos por encontrar nuevas toxinas que permitan un espectro mayor de acción y especificidad contra plagas no sensibles a las proteínas hasta ahora identificadas (Carozzi et al, 1991). Si bien son escasos los reportes sobre toxinas de *Bt* específicas contra coleópteros y en particular contra Melolonthidae, en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de nuevas variedades.

La técnica PCR ha surgido como una herramienta de enorme importancia para optimizar esta búsqueda (Núñez-Valdéz, com. pers.).

II.3. Biosistemática de la familia Melolonthidae

Los escarabajos de la familia Melolonthidae son un grupo de insectos que incluye algunas plagas de enorme importancia económica, sobre todo en su etapa larvaria que es en la que ocasionan los mayores daños a los cultivos agrícolas. Paradójicamente, esta etapa ha sido la menos estudiada. En 1976 se inició el estudio de las larvas y pupas de las especies mexicanas de Melolonthidae, y a la fecha se ha reunido información diagnóstica de las larvas de tercer estadio de 56 géneros y de las pupas de 36 géneros, de los 110 reconocidos para el país (Morón & Deloya, 1991). Estas cifras nos indican que es posible reconocer al 50% de los géneros en estado larvario y a un 33% de ellos en estado pupal.

A nivel de especie el conocimiento sobre las características larvales y pupales es bastante inferior, y aún se sabe poco sobre los ciclos vitales completos de un 95% de las especies mexicanas (Morón et al., 1997).

Este aspecto adquiere gran importancia si recordamos que estos coleópteros pasan entre el 75% y el 90% de su vida en forma de larvas, estado en el cual interactúan con mayor intensidad con su medio ambiente en tres formas (Morón, 1996):

- a) consumiendo grandes cantidades de alimento;
- b) evacuando proporciones importantes de desechos ricos en nutrientes nitrogenados y
- c) alimentando a una amplia gama de depredadores, parásitos y parasitoides

1. Esquema de clasificación general

Hasta la fecha ningún autor ha propuesto un esquema de clasificación basado en un análisis filogenético que incluya a todas las tribus o subtribus que se manejan actualmente. Ello se debe principalmente a la desigualdad en los niveles de conocimiento sobre la taxonomía y la sistemática de cada subfamilia, tribu o subtribu. Mientras que los Dynastinae son los mejor estudiados a un nivel alfa-taxonómico de manera integral a nivel mundial (Endrödi, 1966-1978 en Morón et al., 1997), las revisiones sobre los Melolonthinae están dispersas en el tiempo y en distintas regiones, y su catálogo mundial contiene numerosas imprecisiones y amplias lagunas, además de que arrastra agrupamientos que no han sido revisados en más de cien años. De acuerdo con este sistema, la familia Melolonthidae está representada en México por 6 subfamilias, 23 tribus, 19 subtribus, 119 géneros y 1017 especies, aunque Morón et al. (1997) estimaron la presencia de 110 géneros y 1040 especies de melolontidos en el territorio mexicano.

En la actualidad, a nivel mundial se manejan varias clasificaciones supragenéricas para los Coleoptera Lamellicornia o Scarabaeoidea. Una de ellas es la de Endrödi (1966), que considera a cinco familias: Trogidae, Passalidae, Lucanidae, Melolonthidae, y Scarabaeidae, donde los grupos fitófagos quedan incluidos como subfamilias de Melolonthidae: Melolonthinae, Rutelinae, Dynastinae y Cetoniinae (en Morón et al., 1997) (Cuadro 1). En dicha clasificación Endrödi y Morón (1983) ubican en la categoría de familia a la subfamilia Melolonthinae de los Scarabaeidae de la clasificación de Crowson de 1981 (en Morón et al., 1997).

Esta clasificación es conveniente desde el punto de vista agronómico, ya que las especies de Melolonthidae son las causantes de rizofagia en los cultivos (Morón et al., 1997).

Cuadro 1. Clasificación general de la familia Melolonthidae en México (tomado de Morón et al., 1997)

SUBFAMILIAS	TRIBUS	SUBTRIBUS
Melolonthinae	Melolonthini	Diplo-taxina Melolonthina Rhizotrogina
	Macro-dactylini	Cerasplina Macro-dactyllina
	Hoplini	Hoplina
	Sericini	Sericina
	Chasmatopterini	
	Pachydemini	
Rutelinae	Rutelini	Areodina Heterosternina Pelidnotina Rutelina Antichirina
	Anomalini	Anomalina Anisoplina Dilophochillina
	Anoplognathini	Phalangogonina Platycoelina
	Gentatini	
Dynastinae	Ciclocephalini	
	Pentodontini	
	Oryctini	
	Dynastini	
	Agaocephalini	
	Phileurini	
Trichlinae	Incaini	
	Trichlini	
Valginae	Valgini	
Cetoniinae	Gollathini	Coryphocerina
	Cremastochellini	Cremastochellina
	Gymnetini	Gymnetina
	Cetoniini	Cetoniina

2. Distribución y diversidad

Los miembros de esta familia se han encontrado en casi todos los ambientes continentales e insulares del país, desde el nivel del mar hasta los 3,800 m. de altitud. En los bosques tropicales perennifolios se localizan entre 30 y 45 géneros que agrupan entre 54 y 115 especies. Los bosques tropicales caducifolios y subcaducifolios hasta ahora estudiados albergan entre 23 y 34 géneros con 61 a 105 especies. Mientras que en el tipo de bosque calificado por Rzedowski en 1978 como mesófilo de montaña, habitan entre 17 y 22 géneros con 57 a 64 especies (en Morón et al., 1997). Los bosques de coníferas y encinos reúnen entre 11 y 19 géneros con 29 a 45 especies de Melolonthidae (Morón, 1996).

Con los datos disponibles actualmente se puede señalar que en México, las entidades con mayor diversidad de Melolonthidae son Oaxaca, Chiapas y Veracruz, en donde se han registrado entre 220 y 223 especies; los estados con riqueza intermedia son Durango, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México y Puebla, en cada uno de los cuales están registradas entre 105 y 144 especies. Por otra parte, once entidades presentan menos de 40 registros específicos, pero es evidente que tales cifras no reflejan una pobreza faunística, sino la escasez de trabajo de campo en sus localidades (Morón et al., 1997).

La diversidad de Melolonthidae está siendo impactada por las modificaciones en los ecosistemas característicos del país, derivadas de la expansión de la frontera agropecuaria, los asentamientos humanos, las grandes obras para la comunicación y el abastecimiento de materia prima y combustibles. Por una parte, se ha favorecido la dispersión y el aumento de las poblaciones de un buen número de especies muy adaptables, que ahora se consideran como plagas agrícolas. Por el contrario, muchas otras especies, sobre todo silvícolas, están disminuyendo sus áreas de distribución y sus poblaciones, hasta el punto en que ahora se les consideran raras o en peligro de extinción (Morón, 1996).

3. Hábitos alimenticios

De acuerdo con Morón (1983), los adultos y larvas de Melolonthidae consumen sustratos muy diferentes. En su etapa larval se alimentan de raíces, humus, hojarasca, madera podrida; y como adulto se alimentan de follaje, flores, polen, savia, y del fruto. Esto a diferencia de otras familias de coleópteros en que tanto adultos como larvas se nutren de sustratos similares.

En el estado adulto se alimentan con tejidos y secreciones vegetales, otros aprovechan distintos tipos de restos vegetales, y unas pocas especies pueden depredar a otros insectos.

Como larvas pueden alimentarse con raíces, tejidos xilosos en distintas etapas de descomposición, hojarasca y humus (Morón et al., 1997).

No todas las larvas de esta familia son nocivas para las plantas cultivadas, ya que muchas de ellas, como la mayor parte de las especies de *Cyclocephala*, *Lygyrus* y *Euphoria* presentan actividad saprófaga y las encontramos sobre todo en suelos muy humificados o abonados con estiércol (Morón et al., 1997).

Otras como las larvas de algunas especies de *Anomala*, *Eutheola*, *Dyscinetus* y *Cotinis*, sólo se alimentan de raíces en suelos con escasa materia orgánica, y cuando están sometidas a una presión de competencia inter o intraspecifica. En cambio, la mayoría de las especies de *Phyllophaga*, *Macroductylus*, *Orizabus* y *Anomala*, sí son capaces de causar serios daños a los cultivos agrícolas o en los viveros forestales (Morón, 1983).

4. Ciclo biológico

El conocimiento de los aspectos taxonómicos y ecológicos, ofrece elementos de suma importancia para el apropiado manejo de insectos plaga. Pero es indudable que el estudio de su biología, en especial de sus ciclos de vida, determina en gran medida la eficacia de cualquier estrategia de control que se pretenda establecer (Villalobos, 1995).

En lo referente a su ciclo biológico, los melolóntidos son insectos holometábolos (presentan metamorfosis completa). Durante su desarrollo atraviesan por cuatro fases marcadamente distintivas: huevo, larva, pupa y adulto (Figura 3).

Huevo

La forma del huevo puede ser esferoide, elipsoide o ligeramente cilíndrica. Su color varía de un blanco perlado translúcido a un blanco cremoso. Conforme se desarrolla el embrión, el huevo incrementa su volumen casi al doble del tamaño en comparación al huevo recién ovipositado y se torna prácticamente esférico.

Larva

El estado larval consta de tres estadios (Figura 3). El primero emerge cuando se rompe la cubierta del huevo (corión); consta de un cráneo o cápsula cefálica con partes bucales masticatorias. Cada uno de los tres segmentos torácicos posee un par de patas y se han diferenciado 10 segmentos abdominales. Después de pocas horas de haber emergido, el cráneo y estigmas respiratorios se oscurecen y endurecen.

Un cambio significativo en las dimensiones del cráneo tiene lugar en el paso del primer estadio larval al segundo, y del segundo al tercero (Villalobos, 1995). Reinhard, entre 1940 y 1946, trabajó con varias especies de *Phyllophaga* y encontró que bajo condiciones de laboratorio la duración del estado larval de las diferentes especies estudiadas, variaba entre 120 y 327 días (en Campos-Bolaños, 1983).

Pupa

Se ha reconocido un estado de prepupa en los melolóntidos que tiene lugar una vez que el tercer estadio está próximo a convertirse en pupa. La pupa se parece morfológicamente al adulto, excepto por que las alas, patas, y la antena están plegadas y próximas al cuerpo (Figura 3).

Cuando la larva de tercer estadio alcanza su madurez, cesa de alimentarse, libera el excremento acumulado y permanece aparentemente inactiva. En realidad, este es un momento de gran actividad metabólica que dará origen a las complejas estructuras del escarabajo adulto (Villalobos, 1995). Una vez que la pupa se ha transformado completamente en adulto, se rompe la exuvia pupal; el patrón de ruptura de esta estructura, en la celda pupal, se sugiere como carácter distintivo en algunas subfamilias (Villalobos, 1995).

La estación del año durante la cual la pupación se presenta, varía en las diferentes subfamilias y frecuentemente también varía en los géneros. En condiciones de campo la pupación dura en promedio un mínimo de 14 días, pero puede alargarse en función de las fluctuaciones de temperatura que se presenten en una determinada localidad (Ritcher, 1958 en Campos-Bolaños, 1983).

Adulto

El adulto teneral posee una cutícula blanda. Permanece en la celda pupal hasta que se endurece la quitina de la cutícula; se expanden las alas a su tamaño normal y maduran los órganos sexuales. La emergencia de los adultos del suelo está básicamente asociada a la función reproductora; dicha emergencia coincide con un marcado incremento estacional de la temperatura y/o de la precipitación pluvial (Villalobos, 1995) (Figura 3).

La duración del período reproductivo puede variar de uno a tres meses según la especie y la localidad. Cuando ocurre, el dimorfismo sexual de las formas adultas se manifiesta en la forma del abdomen, tibias o tarsos; los machos generalmente presentan una masa antenal de mayor tamaño, además de algunos cuernos en ciertos casos. Algunas especies tienen hábitos copulatorios diurnos, vespertinos, crepusculares o nocturnos. Los patrones temporales y espaciales de apareamiento suelen ser muy distintos en las diferentes especies de una misma localidad. Su sistema de apareamiento es complejo y pueden presentarse diferencias intraespecíficas marcadas aún entre especies taxonómicamente muy cercanas. Este sistema se ha dividido arbitrariamente en siete fases interrelacionadas: preemergencia, emergencia, vuelo, apareamiento o cópula, alimentación, oviposición y dispersión (Villalobos, 1995).

El ciclo biológico, que varía con el clima, es más largo en las regiones templadas y más corto en las áreas tropicales. Además, también varía en función de las condiciones climatológicas locales, ya que en regiones secas con estación caliente, las larvas pueden estar por varios meses y reiniciar su actividad durante la época de lluvias. En los escarabajos Melolonthidae se distinguen algunas variantes interesantes entre subfamilias, géneros y en algunos casos entre especies. Un caso especial es el observado en Tamaulipas, en donde *Phyllophaga misteca* completa su desarrollo en un año, mientras que *Phyllophaga trichodes* se caracteriza por contar con un ciclo de vida bianual (Villalobos, 1998) (Figura 3).

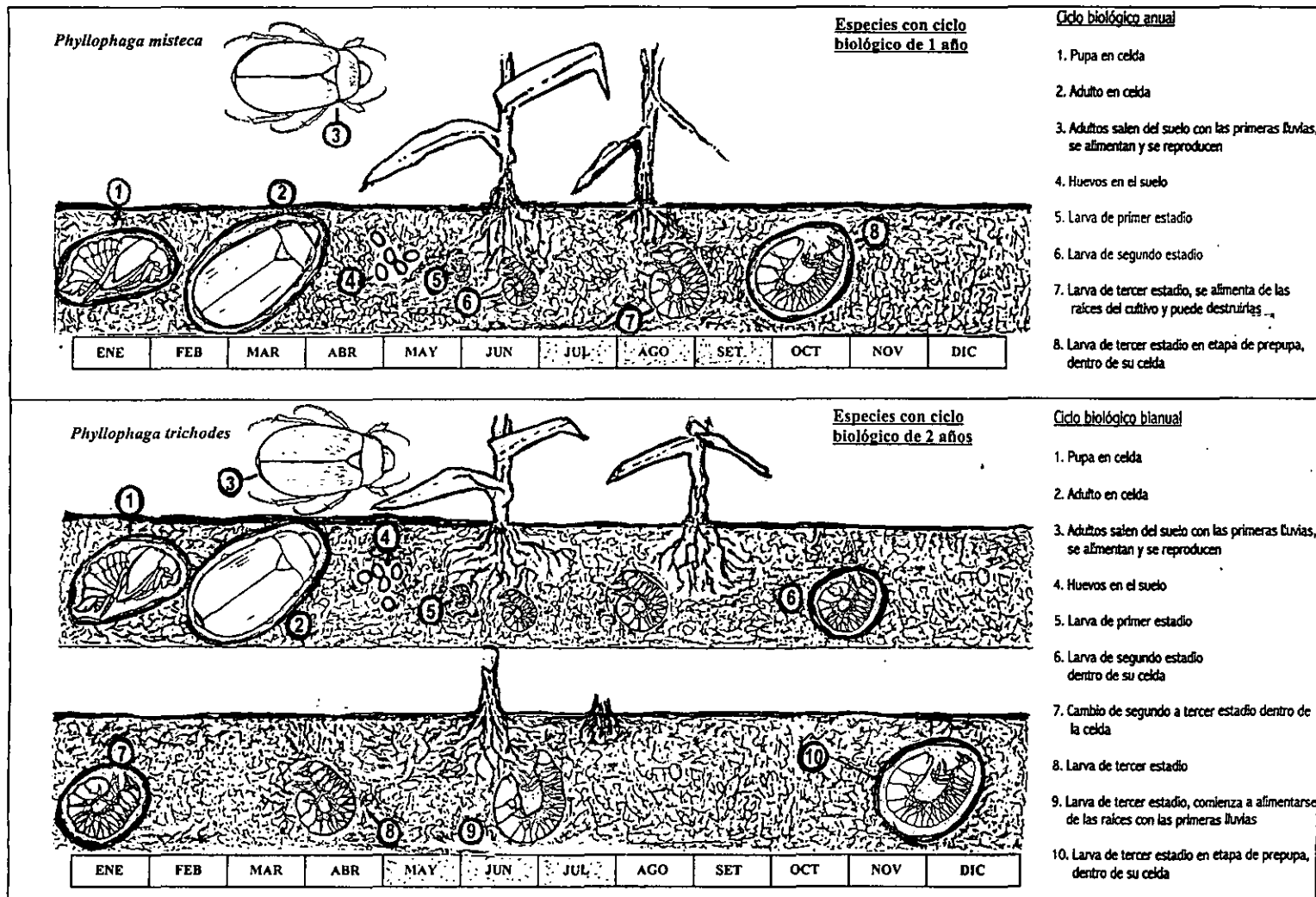


Figura 3. Representación esquemática de las variantes del ciclo biológico de dos especies de Melolonthidae (adaptado de King, 1994).

5. Ecología y daños a la agricultura

La descripción de los patrones espacio-temporales es fundamental para explicar el daño causado por estos insectos. Bajo condiciones de campo, el movimiento vertical de las larvas es más intenso que el movimiento horizontal y depende de los cambios estacionales tanto en la temperatura como en la humedad, además de otras variables ambientales tales como el pH, la textura, la materia orgánica y otros compuestos químicos.

La mayoría de las especies están muy agregadas durante la fase de huevo y en la de larvas de primer, segundo y tercer estadio temprano. Esta distribución se acentúa conforme avanza el desarrollo larval hasta la pupación en la mayoría de las especies (Villalobos, 1995).

La actividad destructora de la gallina ciega se refleja en el sistema radicular de la planta (con una destrucción parcial o total de dicho sistema). En consecuencia las plantas presentan una mala nutrición, un escaso desarrollo tanto del sistema radicular como del vegetativo, y regularmente todo desemboca en la muerte de éstas.

Cuando logran sobrevivir al daño provocado por la larva, su desarrollo se detiene y se presenta una disminución en la altura, debido a que el sistema radicular resulta seriamente afectado, a tal grado que las muy dañadas pueden extraerse del suelo con un mínimo de esfuerzo en relación a las sanas (Ríos & Romero, 1982). A pesar de que el estado adulto puede producir obvios síntomas de herbivoría, no se ha estimado cuantitativamente su daño. Las larvas han sido consideradas en la mayoría de los casos como las principales causantes del daño vegetal. El mayor daño se presenta cuando la agregación larval tiene lugar tanto en el plano vertical como en el horizontal. El daño más grave se produce cuando la herbivoría se concentra en partes sensibles de la planta, como son los sitios próximos a la unión tallo-raíz, y sobre todo se localiza en áreas bien definidas, formando parches o porciones de plantas enfermas (Villalobos, 1995).

El daño causado por gallina ciega puede ser leve, moderado o severo. Esto depende del cultivo, de las condiciones ambientales y del estado de desarrollo en que se encuentre el insecto. El tercer estadio larval es el que ataca a una mayor variedad de plantas de interés agrícola y forestal (Morón, 1984).

Como ya se ha mencionado, en México el cultivo del maíz es en donde el daño es más importante.

En reportes de Amatenango del Valle, Chiapas, se señala que los rendimientos de maíz son de 2.88 ton/ha con daño evidente por gallina ciega, y de 3.34 ton/ha sin daño aparente, lo cual sugiere una pérdida de alrededor de media tonelada de grano por hectárea (en Castro-Ramírez et al., 1998).

En la región de la Reserva de la Biósfera del Cielo, en Joya de Salas, Tamaulipas, la producción de maíz oscila alrededor de 2 ton/ha/año. El daño causado por gallina ciega alcanza un 48% de la producción, por lo que el promedio de cosecha de maíz es de 1.1 ton/ha/año (Villalobos, 1999). Si consideramos que la producción promedio del país es de 2.25 ton/ha/año (SAGAR, ciclo 1990-1997, en Barreda, 2000), es urgente una estrategia de manejo de la gallina ciega a corto plazo, lo que impulsaría en algunas localidades a la producción de rendimientos próximos al promedio del continente Asiático, que es cercano a las 3.43 ton/ha/año (INEGI, 1999 en Barreda, 2000).

De 1970 a 1990 la producción de maíz en México sufrió una disminución de 3 millones de ton/año. Dicha caída está asociada principalmente a cambios económico-sociales que han desfavorecido a los productores. Sin embargo, muy probablemente obedece también a una paulatina degradación del suelo, provocando una pérdida de su fertilidad, además de un continuo incremento en el surgimiento y ataque de nuevas variedades de plagas (Villalobos, 1995).

II.4. *Bt* y su viabilidad en el manejo sustentable de la gallina ciega

Muchos de los beneficios que se atribuyen a las lombrices de tierra (Anderson, 1988; Lee, 1983; Lavelle, 1983; Fragoso, et al., 1993; citadas en Villalobos, 1994b), hormigas (Lal, 1988 en Villalobos, 1994b), termitas (Lee, 1983 en Villalobos, 1994b) y colémbolos (Villalobos, 1990 en Villalobos, 1994b), pueden ser atribuidos también a las gallinas ciegas (Villalobos, 1994b). Pero por el contrario, muchas características negativas son asociadas con especies de *Melolonthidae* que se han considerado históricamente como plagas. Algunos de estos aspectos negativos de las gallinas ciegas sobre las funciones del suelo son evidentes cuando se presentan altas densidades de estas larvas y condiciones pobres de fertilidad en el suelo. En efecto, el contenido de materia orgánica en el suelo de pasturas de una localidad de Nueva Zelandia juega un papel importante en la reducción de la rizofagia y daño causado por las larvas de *Costelytra zealandica* y en los mecanismos de regulación natural de las poblaciones larvales (Villalobos et al., 1993; Villalobos, 1994a; 1994b). Observaciones similares sugieren que *Macrodactylus mexicanus*, especie considerada como rizófaga, completa su ciclo de vida en suelo carente de raíces vivas en el laboratorio. Así mismo, se han observado larvas de segundo y tercer estadio de esta especie alimentándose activamente en el suelo de un cultivo de maíz durante la fase de post-cosecha, cuando plantas vivas de maíz estaban ausentes (Villalobos, 1992). Esto sugiere la existencia de una naturaleza dual de la gallina ciega, que oscila entre la saprofagia y la rizofagia (Villalobos, 1994b).

Este potencial positivo de la gallina ciega se traduce en sus funciones que desarrolla en el suelo. Entre ellas, destacan las funciones ecológicas (migraciones, movimiento vertical y horizontal, efectos sobre la erosión del suelo), las químicas (movilización y prevención de lixiviación de nutrientes, redistribución horizontal de nutrientes, catálisis de mineralización, humificación) y las biológicas (interacciones tróficas con las raíces de las plantas y la materia orgánica del suelo, interacciones tróficas con microorganismos, dispersión de micorrizas, poda y regeneración de raíces) (Villalobos, 1994a).

Aunque faltan muchos estudios cuantitativos detallados, con las estimaciones cualitativas obtenidas hasta el momento en algunas regiones, se puede asegurar que estos insectos constituyen una piedra angular de las redes tróficas porque consumen gran cantidad del sustrato alimenticio, evacúan proporciones importantes de heces ricas en nutrientes nitrogenados y alimentan a una amplia gama de depredadores, parásitos y parasitoides (Morón, et al., 1997).

En este sentido, *Bt* puede brindar también beneficios a la fertilidad del suelo. No se cuenta en la actualidad con reportes que confirmen lo anterior, pero si se tienen registros en este sentido con otros entomopatógenos, como es el caso de *Serratia entomophila*. Al utilizarla en contra de larvas de *Costelytra zealandica* que afectan los pastos de Nueva Zelandia, además de reducir las poblaciones de este insecto junto con la diversificación de sus enemigos naturales y biota del suelo, puede contribuir a la nutrición de las plantas e incrementar la producción de nuevas hierbas y raíces vivas. De esta manera se fomenta la degradación de sustancias húmicas y no húmicas a corto plazo, liberando así nitrógeno para las plantas y la biota del suelo. Este efecto fue evidente particularmente en un suelo con alto contenido de materia orgánica (Villalobos, 1994a).

Algo similar podría visualizarse al utilizar *Bt* en el suelo, ya que en el presente estudio no se fomenta de ninguna manera su uso para la erradicación de la gallina ciega. Al contrario, lo que se persigue es compaginar los posibles beneficios de esta bacteria al suelo con los efectos positivos que al mismo tiempo ofrece la actividad de las gallinas ciegas; de esta manera, indudablemente se estará en vías de un manejo sustentable de los recursos.

De esta manera, es posible visualizar en un futuro a la gallina ciega ya no como una plaga, sino como un regenerador del suelo con un enorme potencial. En un escenario de este tipo, el uso de las toxinas de *Bt* inductivas de la anorexia en gallinas ciegas, podría tener un valor importante para dirigir sus hábitos alimenticios hacia la saprofagia.

III. HIPÓTESIS Y RESULTADOS ESPERADOS

HIPÓTESIS

Si la cepa KB92 (*Buibui*) de *Bt* presenta actividad tóxica contra larvas de la familia Melolonthidae en Japón, entonces esta misma cepa y todas las demás que son portadoras del gene *cry8C* deben ser tóxicas también para larvas de la familia Melolonthidae en México, en condiciones controladas de laboratorio.

RESULTADOS ESPERADOS

1. La actividad tóxica contra estos insectos producida por la cepa KB92 podría esperarse también con cepas de *Bt* nativas, pertenecientes a la colección del IBt-UNAM que sean portadoras de los genes *cry8C*.
2. El mecanismo de toxicidad de las cepas de *Bt*, probadas en mezclas espora:cristal, presentará como factor fundamental el cristal aislado, siendo suficiente para provocar efectos tóxicos (particularmente anoréxicos) en las gallinas ciegas. Se espera que la presencia de la espora no sea indispensable en tal evento.
3. Los diferentes estadios de la gallina ciega presentarán diferencias en la susceptibilidad a la actividad tóxica de *Bt*.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la patogenicidad de cepas mexicanas de *Bt* provenientes de la colección del IBt-UNAM y de la cepa KB92 (*Buibui*) originaria del Japón, en larvas de Melolonthidae

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Seleccionar mediante la técnica PCR, cepas de *Bt* portadoras de los genes tipo *cry8C*, potencialmente tóxicas en contra de larvas de Melolonthidae.
2. Obtener una cría de larvas de Melolonthidae del primero, segundo y tercer estadio, en el laboratorio, para la realización de bioensayos de infección
3. Implementar bioensayos que permitan la evaluación de la patogenicidad de cepas de *Bt*, contra larvas de diferentes especies de Melolonthidae en sus diferentes estadios de desarrollo
4. Comparar la actividad tóxica de cepas de *Bt* contra larvas de diferentes estadios larvales
5. Evaluar la CL₅₀ de cepas seleccionadas por su patogenicidad, en un bioensayo diseñado para ello
6. Determinar si el cristal aislado de *Bt*, puede causar por sí solo efectos anoréxicos en especies mexicanas de gallina ciega

V. METODOLOGÍA

La metodología utilizada en el presente trabajo se esquematiza en la Figura 4.

V.1. Obtención y manejo del material biológico para los bioensayos

1. Obtención del material de *Bt*

Las cepas de *Bt* con los genes *cry8C* (cepa KB92), *cry8A* y *cry8B* (cepa PS50), utilizadas en el presente estudio, fueron facilitadas por Mycogen Corporation, de San Diego, California. A partir de ellas es posible la expresión de los distintos genes *cry8*, por lo que se utilizaron como control de las cepas por identificar y caracterizar. Las cepas mexicanas que se encuentran en la colección particular del IBT-UNAM, fueron aisladas de muestras de suelo de diversas regiones del país entre 1991 y 1994 por Cerón y colaboradores (Bravo et.al., 1998). El aislamiento de las cepas se basó en la selección de esporas por medio de pasteurización.

Las cepas de *Bt* se reconocen por la morfología colonial característica y por la producción de cuerpos parasporales refringentes al microscopio de contraste de fases.

1.1. Obtención del DNA de las cepas bacterianas para su uso como templado en la PCR

El templado de DNA se obtuvo de la siguiente manera:

- a) Las cepas de *Bt* se crecieron por 12 hrs. en placas con medio LB.
- b) Se transfirió una porción de células provenientes de una colonia a 0.1 ml de agua y se llevó a un baño de ebullición durante 10 min. para la lisis celular.
- c) Se agregó 1/10 de volumen de amortiguador TAE 10X.
- d) Se procedió a realizar una extracción fenol-cloroformo para la eliminación de proteínas de la siguiente manera:
 - i) Se adicionó ½ volumen de fenol saturado y equilibrado con buffer TE pH8, más ½ volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1.
 - ii) Se agitó durante 30 seg. en vortex y después se centrifugó por 5 min. a 14,000 rpm en la centrifuga Eppendorf Mod. 5415C.
 - iii) Se recuperó la fase acuosa, adicionándole 1 volumen de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1; se agitó durante un min. en vortex y se centrifugó durante 5 min. (en las condiciones citadas en el inciso anterior), tomando sólo la fase acuosa. Este paso se repitió una vez más.
 - iv) Se adicionó 1/10 de volumen de Acetato de Sodio 3M pH7 y 2 volúmenes de etanol absoluto para precipitar el DNA.

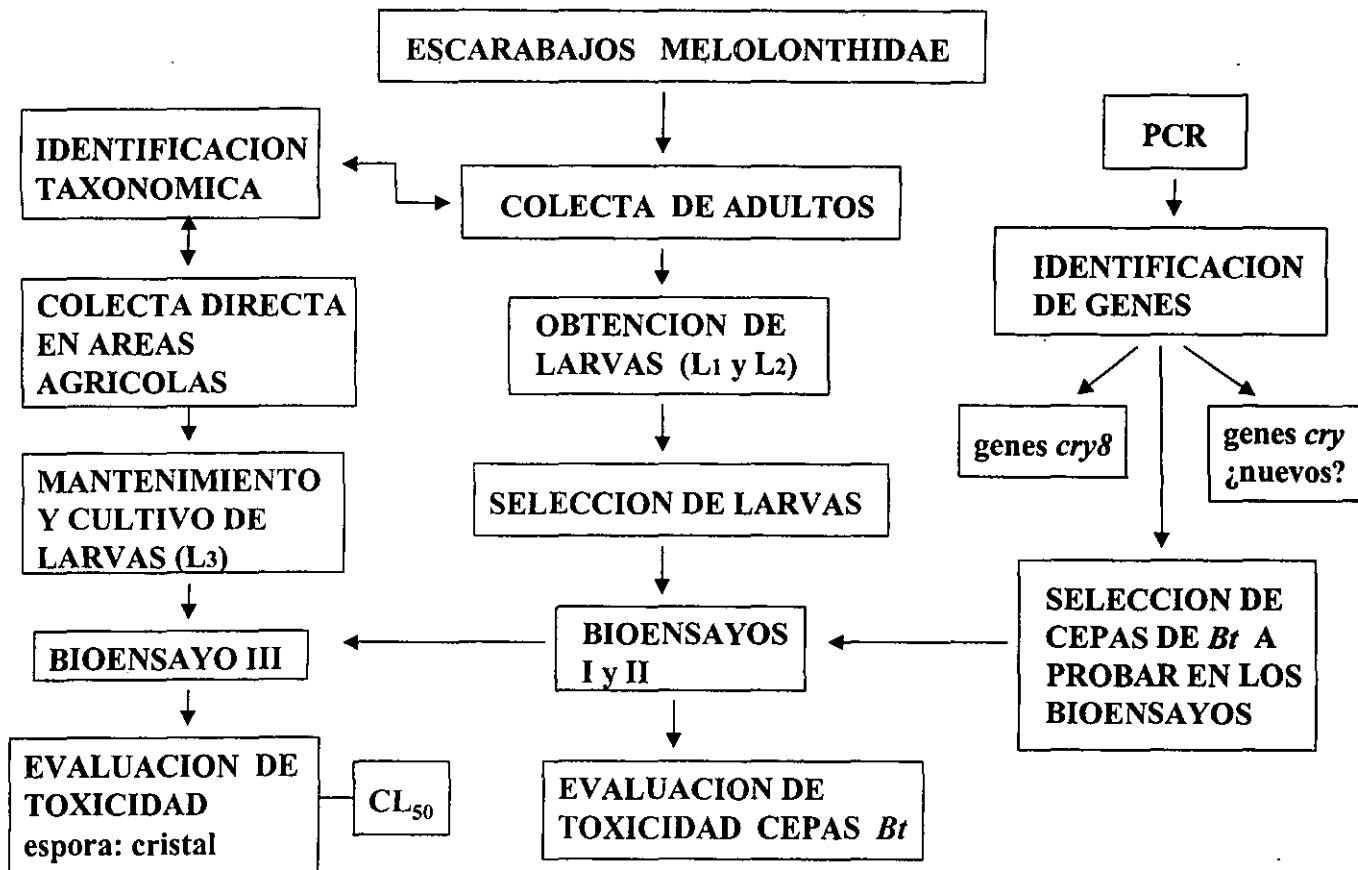


Figura 4. Metodología utilizada en el presente estudio

v) Después de dejarse a -70°C por 15 min., se centrifugó por 15 min. en las condiciones descritas en el inciso ii).

vi) La pastilla obtenida se resuspendió en 100 μl . de agua destilada.

1.2. Condiciones de PCR y electroforesis en gel de agarosa para la identificación de genes *cry8*

En el presente trabajo, el análisis por PCR se realizó de la manera siguiente:

a) Se obtuvo una muestra de DNA para el PCR a partir de la lisis de una porción de células provenientes de cepas de *Bt*, como ya se indicó anteriormente en la sección 1.1. El resultado de la lisis celular se centrifugó durante 10 seg. a 10,000 rpm en una centrífuga Eppendorf MOD. 5415C (Bravo et al., 1998).

b) Para cada cepa se prepararon 3 mezclas de reacción, cada una con el oligo general *der-8* y cada uno de los oligos *rev cry8A*, *rev cry8B* y *rev cry8C* por separado (Figura 5).

Cada mezcla de reacción estaba compuesta por: 2.5 μl . de MgCl_2 10x, para tener una concentración final de 2.5 mM; 10 μl . de agua desionizada ; 2 μl . de cada oligo (10 picomoles/ml. cada uno); 2.5 μl . de dNTP's 10x, para tener una concentración final de 0.25 mM, y 0.5 ml. de Tac polimerasa de la marca Perkin Elmer. A todo lo anterior se le agregaron 6 μl . de la muestra de DNA, y se adicionaron 2 μl . de DNA a cada tubo para cada mezcla de reacción, obteniendo así un volumen total de 25 μl . por análisis de PCR. De dicho volumen total se tomaron 23 μl ., los cuales se colocaron en tubos Eppendorf de 500 μl .,

c) Antes del análisis por PCR se le agregó a cada tubo 50 μl . de aceite mineral de la marca SIGMA para evitar su evaporación.

d) El análisis por PCR se desarrolló en un termociclador Perkin-Elmer Mod.40, traducéndose en la amplificación del segmento de DNA en las siguientes condiciones:

- un primer paso de desnaturalización de 2 min. a 95°C
- 30 ciclos de desnaturalización de 1 min. a 95°C ; unión a 49°C de los oligonucleótidos generales y específicos de *cry8* durante 1 min., y un proceso de extensión a 72°C también durante 1 min.
- un paso adicional de extensión a 72°C durante 5 min.

e) Cuando finalizó la acción del termociclador (después de 2 hr. 40 min. aproximadamente), se tomaron las mezclas y se mantuvieron a 4°C durante algunas horas.

f) Enseguida se llevó a cabo la electroforesis en gel de agarosa, de la siguiente forma:

i) Se preparó un gel de agarosa al 2% con una solución amortiguadora TAE 1x ; además , se utilizó agua desionizada, 0.45 gr de agar y 1.5 μl . de bromuro de etidio (10 mg/ml).

ii) La solución obtenida se vació en un molde de plástico y se dejó gelificar durante 10 min.

iii) El gel obtenido se sumergió en el buffer de electroforesis TAE 1x, en una cámara para este fin, que se encontraba conectada a una fuente de poder.

iv) Se utilizaron los marcadores moleculares: III de Lakeside, lambda /Hind III y pBR 322/ Hinf I, así como los controles de genes *cry*: PS50C (control de *cry8A* y *cry8B*) y KB92 (control de *cry8C*).

v) De cada mezcla de PCR se tomaron 15 µl. de muestra para el gel, después de que se retiró el aceite mineral agregado inicialmente. A cada muestra se adicionaron 3 µl. de buffer de corrimiento 6x, compuesto por 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de cianol xileno y 30% de glicerol en agua.

vi) El corrimiento por electroforesis se realizó a 100 V., durante 60 min aproximadamente.

Cabe señalar que posteriormente se realizaron nuevos análisis de PCR con otras cepas de *Bt* previamente seleccionadas, con el objeto de corroborar su actividad tóxica contra gallinas ciegas. Dichos análisis fueron llevados a cabo por el Ingeniero Agrónomo Marco A. Barreda Díaz de la Universidad Veracruzana, y a pesar de no estar contemplados en el presente trabajo, los resultados fueron utilizados para confirmar la efectividad de estas cepas mediante una determinación de la CL₅₀ por medio de un tercer bioensayo.

1.3. Oligos generales y específicos para identificar genes *cry8*

Los oligos o primers utilizados para la identificación de genes *cry8* fueron diseñados con anterioridad (Bravo et al, 1998) por análisis de computadora con un programa denominado Gene Works 2.3, con base en el alineamiento simultáneo de secuencias de genes *cry* previamente descritas. Los oligos fueron elegidos de una región altamente variable de genes *cry*, basándose en la secuencia de cada uno y a la predicción del tamaño de los productos PCR.

Los oligos elegidos se sintetizaron por medio de un sintetizador de DNA (Microsyn.1450; Systec Inc.) con los requerimientos y condiciones especificadas por el fabricante (Bravo et al., 1998).

Los oligos generales para *cry8*, denominados *gral- cry8*, fueron: *der-8* y *rev-8* (Bravo et al.,1998).

der-8 ATG-AGT-CCA-AAT-AAT-CTA-AAT-G

rev-8 TTT-GAT-TAA-TGA-GTT-CTT-CCA-CTC-G

Los pares de oligos específicos para *cry8* denominados *spe- cry8A*, *spe- cry8B* y *spe- cry8C* fueron: *rev-8A*, *rev-8B* y *rev-8C* (Bravo, et al.,1998).

rev-8A TCT-CCC-CAT-ATA-TCT-ACG-CTC

rev-8B GAA-CAT-CTC-GTA-AGG-CTC

rev-8C GGT-ACT-CGA-TTG-TCC-AGT

1.4. Estimación de tamaños y pesos moleculares de productos PCR

Para la estimación de los pesos moleculares y de los tamaños de molécula de los productos PCR, se requirió un análisis de regresión lineal. Para ello se utilizó el logaritmo de los pesos moleculares de cada marcador empleado en cada reacción de PCR, y la migración de las moléculas a través del gel de electroforesis, esto es, el recorrido en centímetros que presentó cada una de las bandas en sus respectivos carriles a partir de la región inicial del gel (Figuras 6 y 7). Con este método, fue posible obtener la ecuación de regresión, con la cual se llevaron a cabo las estimaciones de los pesos moleculares y tamaños de las moléculas representadas en el gel. Estos resultados se corroboraron con el programa SEQUAID II Win 3.1 (Douglas & Donald, 1989), que se basa en la migración de proteínas en el gel en relación con los marcadores de peso molecular utilizados (Bio Rad) (en Barreda, 2000).

2. Cría y mantenimiento de las larvas de Melolonthidae

La obtención de larvas vivas para su uso en los bioensayos, tuvo como base dos fuentes principales: la colecta de adultos para inducir su apareamiento y la colecta directa de larvas en áreas agrícolas.

2.1. Colecta de escarabajos adultos

Entre mayo y junio de 1998 se llevaron a cabo colectas nocturnas (entre 20:30 y 22:00 hrs.) de escarabajos adultos, pertenecientes a las especies *Phyllophaga ravidata*, *Ph. vetula*, *Anomala inconstans*, *A. casteniceps*, *Cyclocephala mafafa*, y a las morfoespecies *Ph. blanchardi* grande y *Ph. blanchardi* chica (Cuadro 3). Estos adultos se colectaron bajo las lámparas que alumbran los edificios y jardines del IBT-UNAM, ubicado en la zona Norte de la Ciudad de Cuernavaca, Morelos. Después de su captura, los adultos se colocaron en recipientes de plástico (capacidad de 1 lt.) con suelo forestal; se colocaron entre 5 y 6 individuos por recipiente. Casi la tercera parte de los adultos que fueron colectados pudieron ser sexados mediante la extracción del edeago una vez que murieron, lo cual permitió hacer una estimación de la proporción sexual. Dicha proporción de hembras y machos en la mayoría de los casos fue 1:1.

2.2. Cultivo y cría de larvas en el laboratorio

A cada recipiente se le colocó suelo forestal fresco, a la mitad de su capacidad, agregando también algunas ramas y hojas de plantas propias de la región, como bugambilia (*Bougainvillea spectabilis*) y azalea (*Rhododendron indicum* Sweet) (Martínez, 1979), insertándolas en la parte superficial del suelo; todo ello con la intención de inducir la alimentación y el apareamiento de los adultos. Todo este sistema se implementó a temperatura ambiente dentro del laboratorio, a un fotoperíodo normal. Desde el momento de su emergencia, las larvas recién nacidas fueron trasladadas a otros recipientes para mantenerlas individualmente. Esto fue posible con la ayuda de una criba Newark del No.10 (2 mm de diámetro) y de un pincel del No. cero, con la intención de no lastimarlas.

Con los huevos encontrados se siguió este mismo procedimiento.

2.3. Colecta de larvas en el campo

Se efectuó una colecta de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga (Phytalus) trichodes* (Bates), una especie de gran importancia económica en el Estado de Tamaulipas (Villalobos, 1999). Dicha colecta se realizó en una población del ejido "20 de abril" Joya de Salas, en la Reserva de la Biósfera "El Cielo" (RBEC), que se ubica al suroeste de Tamaulipas, en las laderas de la Sierra Madre Oriental, conocida como Sierra Cucharas y Sierra Chiquita.

Se seleccionaron áreas de cultivo de maíz con antecedentes y señales de infestación por *Ph. trichodes* (Villalobos, 1999).

Una parte del material se obtuvo directamente del suelo próximo a las raíces de plantas de maíz, con síntomas de daño. En estos sitios se cavó a una profundidad aproximada de 10 cm. para localizarlas; la otra parte se consiguió recolectando las que quedaban expuestas sobre el terreno por el que había pasado una yunta o un tractor.

Los organismos en apariencia sanos se colocaron en recipientes de plástico de 1 lt. de capacidad con suelo del sitio de colecta (de 6 a 9 individuos por recipiente) para su posterior traslado al laboratorio. De esta manera se logró reunir aproximadamente un millar de larvas de tercer estadio.

2.4. Acondicionamiento y mantenimiento de las larvas en el laboratorio

Tanto las larvas obtenidas mediante la cría como las colectadas en el campo se colocaron en condiciones de laboratorio. Tanto a unas como a otras se les colocó en recipientes de plástico de 1 lt y de ½ lt de capacidad, rehidratándoles el suelo continuamente y separando las que se encontraban enfermas o muertas para evitar una posible contaminación por entomopatógenos.

Todas las larvas fueron alimentadas con trozos de zanahoria (*Daucus carota*) fresca de dimensiones variables (cilindros de aproximadamente 4 mm³), de acuerdo al estadio larval en que se encontraban.

3. Selección de larvas para los bioensayos

Para el primer bioensayo se decidió utilizar larvas de primer estadio de *Ph. ravidus* y *A. inconstans*, por ser las especies que procrearon la mayor cantidad de individuos (Cuadro 3). Después de haber conservado estas especies en aislamiento por un período de 15 días, se seleccionaron las larvas que presentaban una apariencia externa sana (mayor tamaño, buena movilidad, apéndices completos, reacción a estímulos externos), para su inclusión en los diferentes tratamientos del bioensayo.

Las 80 larvas seleccionadas (40 por cada especie) fueron colocadas individualmente en placas estériles de ELISA (con 96 pozos), proporcionando a cada una un pequeño trozo de zanahoria. Durante 5 días se les preparó bajo este régimen de "prebioensayo", para eliminar la patogenicidad de fondo, simulando las condiciones a las que se enfrentarían en el experimento. Diariamente se revisó su comportamiento en estas circunstancias, sustituyendo a las larvas que no presentaban actividad de ningún tipo (movilidad, alimentación) por otras en buenas condiciones.

V.2. Bioensayos: características y condiciones

Los bioensayos implementados en este trabajo se basaron en el método propuesto por Calderón (1998), con algunas variantes.

1. Bioensayo I

Después de la selección de las larvas a utilizar, todo se enfocó a la preparación del lugar de trabajo y del instrumental necesario para efectuar el bioensayo. Este primer bioensayo se estructuró de la siguiente manera:

a) Se hizo énfasis en la limpieza y esterilización del área de trabajo así como del instrumental a utilizar, con el uso de etanol al 70% y de agua destilada.

b) Las 4 cepas de *Bt* seleccionadas fueron: IB184, IB205, IB324 e IB477, por ser potencialmente portadoras de genes tipo *cry8C*, según resultados del PCR (sección VI.1, punto 1).

c) Se utilizaron placas de ELISA estériles para dar cabida a las 80 larvas de primer estadio seleccionadas en la cría previamente realizada (sección VI.2, punto 1); se colocaron 8 larvas de cada especie (*Ph. ravidus* y *A. inconstans*) por tratamiento, esto es, 4 cepas de *Bt*, además del tratamiento control.

d) Cada larva se lavó con agua destilada y se secó perfectamente antes de colocarlas en su lugar correspondiente en la placa con la ayuda de un pincel del No. cero. Esto con la intención de que las larvas no llevaran adheridos residuos de suelo en su cuerpo y así disminuir el riesgo de alguna contaminación.

e) La infección de las larvas con *Bt* se realizó utilizando fragmentos cilíndricos de zanahoria fresca de aproximadamente 4 mm³, obtenidos con la ayuda de un horador metálico previamente desinfectado (se determinó utilizar la zona carnosa, excluyendo el centro y la periferia de la zanahoria). Los trozos de zanahoria se impregnaron por rodamiento con cada una de las cepas bacterianas con la ayuda de unas pequeñas pinzas, que permitieron obtener cantidades más o menos uniformes de bacteria. El contenido aproximado de esporas en cada dosis fue de 10⁸ esporas por larva, como lo reportado por Núñez-Valdez & Mahanty (1996). Se utilizó una dosis única de bacteria, y al lote control se le dió zanahoria sin tratar. Todo este proceso de infección se llevó a cabo en condiciones asépticas.

f) Se cubrieron las placas con una toalla de papel húmeda, y se envolvieron con una bolsa de plástico (con algunas perforaciones) para después sujetarlas con unas ligas.

g) Este sistema se mantuvo en incubación dentro de una cámara de crecimiento REVCO Mod. PG-6-7454, a temperatura constante (24°C) y en oscuridad total. Sólo durante las revisiones, que en promedio duraban 2 hrs., las larvas estuvieron fuera de la cámara de crecimiento.

h) Las revisiones y cambios de zanahoria se realizaron diariamente, con cambios de placas cada tercer día (para reutilizar las placas, se desinfectaban 24 hrs antes con una solución de cloro al 10%).

Se llevó un registro de mortalidad, alimentación y síntomas externos de enfermedad de cada larva en cada tratamiento.

2. Bioensayo II

En esencia el procedimiento, material y criterios de evaluación coinciden con lo realizado en el bioensayo I:

a) Se utilizaron larvas de *Ph. ravidia* y de *A. inconstans* (segundo y tercer estadio respectivamente), además, de larvas de tercer estadio de *Ph. trichodes*.

b) Para el empleo de las larvas de *Ph. ravidia*, se utilizaron placas de cultivo celular (24 pozos) estériles, con 8 organismos por tratamiento. Aquí sólo se utilizaron 3 cepas de *Bt*: IB184, IB205, IB477 y el control; la cepa IB324 se excluyó por su baja eficiencia en el bioensayo anterior y por el limitado número de larvas de esta especie con que se contaba en esos momentos.

c) Las larvas de *A. inconstans* y *Ph. ravidia*, 8 por tratamiento, fueron infectadas con las 3 cepas mencionadas anteriormente, pero ahora utilizando para su alimentación trozos de zanahoria con un tamaño mayor al utilizado en el bioensayo anterior (8 mm³ aproximadamente). Se utilizaron en este caso contenedores de plástico (27x10x2.5 cm) con 16 quедades (para preparación de hielo), dado el mayor tamaño de las larvas y para evitar que salieran de su compartimento asignado. Dichos contenedores fueron cubiertos con una tapa de plástico.

d) Para el caso de las larvas de *Ph. trichodes*, se utilizaron las 4 cepas de *Bt* probadas en el bioensayo I más el control, y se colocaron 10 individuos por tratamiento en las hieleras de plástico

e) A diferencia del bioensayo anterior, se requirió la aplicación de una segunda dosis de bacteria a los 15 días de iniciado el tratamiento, ya que en el transcurso de este período no se observaron síntomas de infección en las larvas.

f) La duración total del bioensayo II fue de 35 días.

3. Bioensayo III

Este bioensayo se llevó a cabo de la siguiente manera:

a) Después de algunas pruebas, se utilizaron piezas uniformes de agar LB (8 mm³), conteniendo diferentes proporciones espora:cristal, para inducir el efecto tóxico en las larvas.

b) En este bioensayo se utilizaron 4 cepas de *Bt* previamente seleccionadas. Se utilizaron cristales de *Bt* purificados por gradientes de sacarosa (Barreda, 2000).

Las cepas utilizadas fueron: IB209, IB293 y KB92 (como testigo). Para la cepa IB209 se utilizaron dos mezclas espora:cristal: una en estado prácticamente puro 1:7 (1 espora por 7 cristales), y otra en una proporción 1:1 (1 espora por 1 cristal). Las otras dos cepas se utilizaron en estado prácticamente puro. Hay que señalar que el término "prácticamente puro" se refiere a la superioridad en el número de cristales respecto al de esporas; en el caso de la mezcla de 7 cristales por una espora, se consideró como una proporción que se aproximaba bastante al estado de pureza. El objetivo por el cual se utilizaron estas mezclas espora:cristal fue principalmente el de determinar si la espora puede causar sinergismo en la actividad insecticida, y la importancia real del cristal en este evento. Para cada cepa se manejaron 5 diferentes concentraciones: 10000, 1000, 100, 10 y 1 ng. de proteína por ml. de agar LB, para el cálculo posterior de la Concentración Letal 50 (CL₅₀).

La proteína se cuantificó por el método de Bradford (1976), para obtener la concentración de proteína y determinar la concentración de tripsina necesaria para el procesamiento de la toxina a su forma activa (en Barreda, 2000).

c) Después de pasar por el proceso de selección, se eligieron 252 larvas (12 por tratamiento). Se siguió la misma metodología utilizada en el primer bioensayo, excepto que en este caso se alimentó a cada larva con un bloque de agar LB, conteniendo una mezcla de cristal:espora en las proporciones descritas anteriormente. En el caso de las larvas control, se les asignó su bloque de agar completamente libre de la mezcla espora:cristal.

d) Después de la infección inicial con bloques de agar, se regresó a la dieta con zanahoria (sin bacteria), únicamente para monitorear la inhibición en la alimentación. Se siguió el mismo procedimiento en el momento de la segunda aplicación de *Bt*.

e) Dado que los efectos tóxicos de *Bt* se expresaron lentamente, se realizaron dos aplicaciones. La primera al inicio del bioensayo y la segunda 15 días después.

f) La duración del bioensayo III fue de 30 días.

4. Características generales de los bioensayos

En los tres bioensayos desarrollados en el presente trabajo, se tomó registro de la mortalidad, inhibición de la alimentación (anorexia) y síntomas externos de las larvas originados por la infección bacteriana.

En la mortalidad se evaluó el porcentaje de larvas muertas (o larvas sobrevivientes) en un determinado intervalo de tiempo, de acuerdo a las características de cada bioensayo. La inhibición de la alimentación, se evaluó al comparar el porcentaje de zanahoria remanente de cada una de las larvas después de 24 hrs con una pieza de zanahoria intacta, con las dimensiones originales. Cada pieza estándar de zanahoria (dimensiones originales de acuerdo al bioensayo) se consideró como un 100%. Si la larva consumía la mitad de la pieza, se consideraba como un 50% de alimentación, si consumía la cuarta parte un 25% y así sucesivamente.

Si el cilindro de zanahoria no era consumido en más de un 70%, se consideraba que la larva dejaba de alimentarse con normalidad. Este 70% se tomó como el punto crítico en el cual daba inicio el efecto anoréxico. El siguiente criterio fue considerar como anoréxicas a las larvas que no se alimentaran durante 7 días consecutivos, como resultado del ataque bacteriano.

Se utilizó también un índice de morbi-mortalidad, como el sugerido por Calderón (1998), en el cual se representa la suma de los porcentajes de larvas que exhiben síntomas de la enfermedad ambarina y el porcentaje de larvas que presumiblemente murieron por el ataque bacteriano durante el bioensayo de infección.

En nuestro trabajo, este índice sufrió algunas modificaciones, para adaptarlo a la actividad de *Bt*. En este caso, se tomó como criterio principal el determinado por Sharpe (1976), que maneja una "coloración café rojiza o parduzca" en el cuerpo de las larvas, provocada presumiblemente por *Bt*. En este sentido, Villalobos (obs. pers.) ha detectado cierto "ennegrecimiento" en bioensayos similares. En los tres bioensayos realizados, por razones prácticas, se manejó el "ennegrecimiento" de las larvas inoculadas con las diferentes cepas de *Bt*, para la determinación del índice de morbi-mortalidad.

V.3. Análisis estadístico de datos

Todas las observaciones diarias de cada bioensayo se vaciaron en hojas de registro que permitieron un adecuado análisis de los resultados. Fue posible manejarlos de distintas maneras, enfocando su análisis a los porcentajes de sobrevivencia de larvas en cada tratamiento, además de los relacionados al efecto anoréxico y morbi-mortalidad provocados por la actividad tóxica de *Bt*.

Los datos obtenidos en cada uno de los bioensayos, se analizaron mediante la prueba de χ^2 y el programa POLO PC (PROBIT 50), para el cálculo de la CL_{50} , específicamente en el bioensayo III.

VI. RESULTADOS

VI.1. Selección de cepas de *Bt*

1. Cepas para bioensayos I y II

El análisis por PCR se realizó mediante el uso de oligos denominados "generales" y oligos denominados "específicos", capaces de identificar genes *cry1*, *cry3*, *cry5*, *cry7*, *cry8*, *cry9*, *cry11*, *cry12*, *cry13*, *cry14*, *cry21* y genes *cyt* (Bravo, et al., 1998). Se llevó a cabo una reacción de PCR sencillo con oligos generales, un oligo derecho y uno reverso. Así mismo se realizó también un PCR con los oligos específicos, en una reacción conocida como "PCR múltiple", ya que se utilizó un oligo derecho y varios oligos reversos en la misma reacción (Figura 5). Una característica de suma importancia de esta técnica es que cada gen *cry* promueve un producto de PCR con un peso molecular único; el gen *cry8A* genera un producto de 338 pb.; el gen *cry8B* un producto de 510 pb. y el gen *cry8C* uno de 963 pb. (Bravo et al., 1998). Si llegan a detectarse cepas con productos PCR de un peso diferente a lo esperado, se abre la posibilidad de que contengan genes *cry* nuevos.

El análisis con los oligos generales *cry8* permitió la detección de 21 cepas de *Bt* con productos PCR de interés (Bravo et al., 1998). De estas 21 cepas, mediante el análisis con los oligos específicos para los genes *cry8A*, *cry8B* y *cry8C*, se detectaron 13 cepas con productos PCR de interés. Dichas cepas son potencialmente tóxicas contra plagas de Melolonthidae.

El análisis por PCR múltiple presenta el inconveniente de que aún cuando se generan productos de PCR con el tamaño esperado para los genes en estudio, existe la incertidumbre en cuanto a los oligos específicos de los cuales dichos productos de PCR han sido generados. Esta incertidumbre se incrementa cuando se obtienen productos de PCR de tamaño inesperado, lo que sugeriría la existencia de genes *cry* nuevos. En estos casos, se requiere de la aplicación de nuevas reacciones de PCR de manera individual, con cada uno de los oligos específicos (*cry8A*, *cry8B* y *cry8C*).

En el presente trabajo se realizaron reacciones de PCR con oligos *cry8* específicos, cada uno en una reacción individual. De las 13 cepas aisladas previamente en el laboratorio, se seleccionaron al azar 4 cepas para este análisis: IB184, IB205, IB324 e IB477. Se utilizaron como controles las cepas positivas PS50C (que contiene a los genes *cry8A* y *cry8B*, capaces de formar productos PCR de 338pb. y 510 pb. respectivamente) y la cepa KB92 (que contiene al gen *cry8C*, capaz de formar un producto PCR de 963 pb.).

En las figuras 6 y 7 se muestran los resultados del análisis electroforético de productos PCR generados a partir de las cepas control PS50C y KB92, y las cepas IB184, IB205, IB324 e IB477.

La cepa control PS50C presentó un producto de 338 pb. en la reacción con los oligos específicos para *cry8A*, así como un producto de 510 pb. con los oligos para *cry8B* (Figuras 6 y 7). Así mismo, la cepa control KB92 presentó un producto de 963 pb. en la reacción con los oligos para *cry8C* (Figuras 6 y 7).

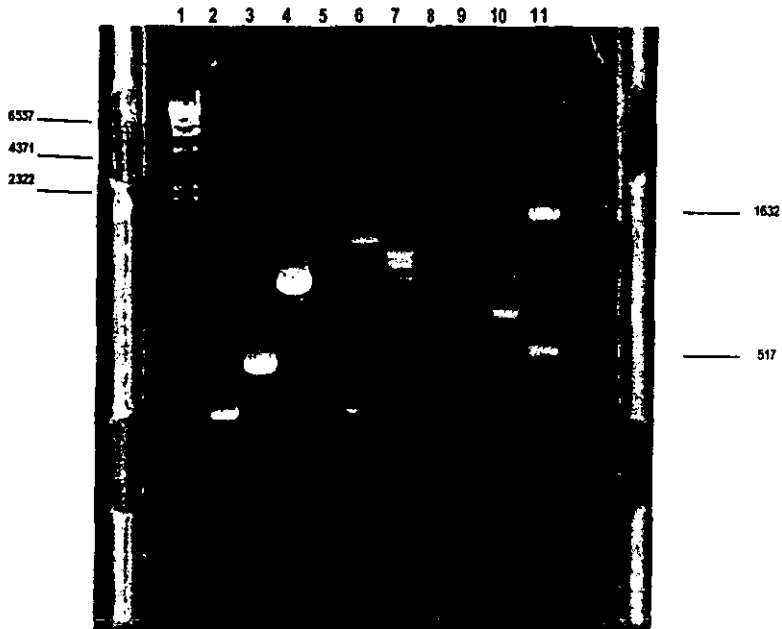


Figura 6. Amplificación por PCR de fragmentos de genes *cry8*, de las cepas IB184 e IB324 de *Bt*, en gel de agarosa al 2%. Carril 1.-Marcador molecular lambda / Hind III. Carril 2.-Cepa control PS50C (*cry8A*). Carril 3.-Cepa control PS50C (*cry8B*). Carril 4.-Cepa control KB92 (*cry8C*). Carril 5.-Cepa IB184 (oligo específico *cry8A*). Carril 6.-Cepa IB184 (oligo específico *cry8B*). Carril 7.-Cepa IB184 (oligo específico *cry8C*). Carril 8.-Cepa IB324 (oligo específico *cry8A*). Carril 9.-Cepa IB324 (oligo específico *cry8B*). Carril 10.-Cepa IB324 (oligo específico *cry8C*). Carril 11.-Marcador molecular pBR322 / HinfI.

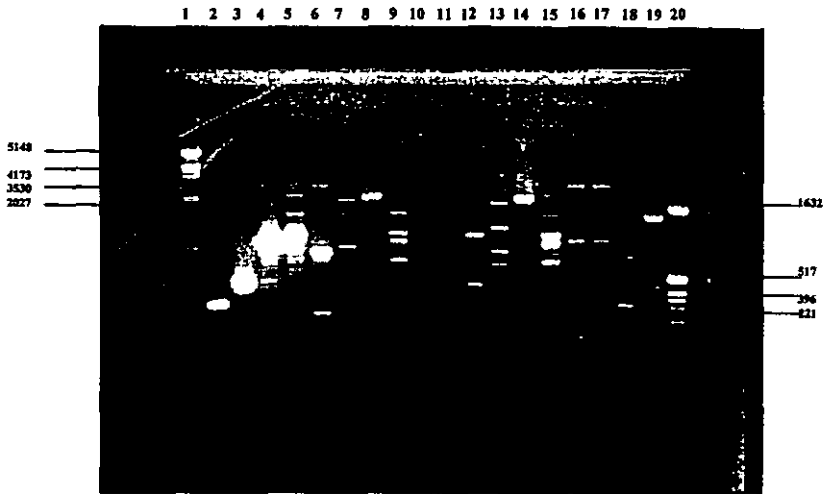


Figura 7. Amplificación por PCR de fragmentos de genes *cry8*, de las cepas IB205 e IB477 de *Bt*, en gel de agarosa al 2%. Carril 1.-Marcador molecular λ de Lakeside. Carril 2.-Cepa control PS50C (*cry8A*). Carril 3.-Cepa control PS50C (*cry8B*). Carril 4.-Cepa control KB92 (*cry8C*). Carril 7.-Cepa IB205 (oligo específico *cry8A*). Carril 8.-Cepa IB205 (oligo específico *cry8B*). Carril 9.-Cepa IB205 (oligo específico *cry8C*). Carril 13.-Cepa IB477 (oligo específico *cry8A*). Carril 14.-Cepa IB477 (oligo específico *cry8B*). Carril 15.-Cepa IB477 (oligo específico *cry8C*). Carril 20.-Marcador molecular pBR322 / *Hinf*I.

Cuadro 2. Productos PCR generados a partir de cepas de *Bacillus thuringiensis*, con oligos dirigidos a genes *cry8*

CEPA	PRODUCTO PCR específico para <i>cry8A</i>	PRODUCTO PCR específico para <i>cry8B</i>	PRODUCTO PCR específico para <i>cry8C</i>	GENE INVOLUCRADO
IB184	ninguno	1505	1383, 1186, 963 , 762	<i>cry8C</i> , ?
IB205	2744, 2002, 1604, <u>825</u>	2776	2441, 1641, <u>1170</u> , <u>963</u> , <u>695</u>	<i>cry8C</i> , ?
IB324	2028	ninguno	1071, <u>262</u>	?
IB477	1888, <u>1270</u> , 824, 630	2098	2441, 1604, <u>1104</u> , <u>963</u> , <u>676</u>	<i>cry8C</i> , ?

*Los productos PCR señalados con negritas, representan a los de tamaño esperado

*Los productos PCR subrayados, representan las bandas observadas con buena intensidad en la placa de electroforesis

*El resto de los productos PCR representan a las bandas que se observan con poca intensidad en la placa de electroforesis, lo que sugiere una probable unión inespecífica de los oligos al templado de DNA

* El signo de interrogación sugiere la existencia de genes nuevos del tipo *cry8*

La cepa IB184 presentó diferentes productos PCR, destacando los de tamaño 963 y 1186 pb. en la reacción con oligos para *cry8C* (Cuadro 2, Figura 6, Carril 7).

Para la cepa IB205 sobresalieron los productos PCR de tamaños 695, 963 y 1170 pb. en la reacción con oligos para *cry8C* (Cuadro 2, Figura 7, Carril 9).

Para la cepa IB324, el producto PCR de tamaño 762 pb. fue el único de los productos obtenidos que sobresalió, esto para la reacción con oligos para *cry8C* (Cuadro 2, Figura 6, Carril 10).

La cepa IB477 ofreció varios productos PCR de importancia, destacando entre ellos los de tamaño 676, 963 y 1104 pb. en la reacción con oligos para *cry8C* (Cuadro 2, Figura 7, Carril 15).

De estos resultados se desprende que:

a) Las cepas IB184, IB205 e IB477 pueden contener genes del tipo *cry8C*, por ser las únicas que generaron productos PCR de tamaño esperado 963 pb.; los otros productos PCR de tamaño no esperado de estas mismas cepas pueden considerarse como posibles genes nuevos del tipo *cry8C*.

b) La cepa IB324 no presentó productos PCR de tamaño esperado para ninguna de las reacciones con oligos para *cry8A*, *cry8B* y *cry8C*, aunque sí uno muy cercano a 963 pb., lo que la convierte en portadora potencial de genes nuevos del tipo *cry8C*.

c) Al comparar los patrones de bandeo para las cepas IB205 e IB477, se observa que existe cierta similitud entre ellas. Ambas presentaron un producto PCR de tamaño esperado 963 pb. y prácticamente el mismo número de bandas obtenidas en la placa de electroforesis. Esto sugiere que probablemente se trata de cepas genéticamente parecidas (Cuadro 2, Figura 7).

De esta manera se vislumbró la posibilidad de que el gen *cry8C* fuera el responsable de la actividad tóxica de las cepas seleccionadas para este trabajo, sobre todo en los casos de IB205 e IB477, por lo que se les consideró como potencialmente patógenas contra las larvas de Melolonthidae.

2. Cepas para bioensayo III

Para este bioensayo fueron seleccionadas 3 cepas: IB209 e IB293, pertenecientes a la colección del IBT-UNAM, además de la cepa control KB92 (*Buibui*), nativa de Japón. Resultados preliminares indicaban que las cepas IB209 e IB293 eran potencialmente tóxicas en contra de larvas de Melolonthidae tales como *Phyllophaga ravidata* y *Phyllophaga obsoleta* (Villalobos et al., resultados no publicados).

Al final de este bioensayo, se observó que tanto la IB209 como la IB293 son cepas portadoras de genes del tipo *cry8C* (Barreda, 2000) con base en un análisis por PCR similar al reportado en este trabajo.

VI.2. Obtención de larvas de Melolonthidae

1. Larvas de primero y segundo estadios

Los resultados de la cría de adultos de Melolonthidae para la obtención de primeros estadios se presentan en el Cuadro 3.

De las primeras colectas se contabilizaron 110 escarabajos adultos de *Ph. blanchardi* (morfoespecie chica); 97 de *Ph. ravida*; 61 de *A. casteniceps*; 33 de *Ph. blanchardi* (morfoespecie grande); 27 de *A. inconstans*; 18 de *Ph. vetula*; y 6 de *Cyclocephala mafafa*, conformando así una colección total de 352 escarabajos adultos, en una proporción global de una hembra por un macho (1:1) en cada una de estas especies. Después de 38 días, se obtuvo una gran cantidad de larvas de primer estadio en cada uno de los recipientes. Las revisiones de estas larvas se realizaron en dos etapas: del 14 al 22 y del 23 al 30 de julio de 1998, registrando el número de larvas sobrevivientes después de 16 días de revisión (Cuadro 3).

Con base en la producción de larvas de primer estadio en los cultivos de adultos, se decidió trabajar con larvas de *Ph. ravida* y *A. inconstans* seleccionando las más sanas y resistentes para utilizarlas en el primer bioensayo (Cuadro 3). Para el segundo bioensayo, se utilizaron las larvas sobrevivientes de estas mismas especies que continuaron su desarrollo a segundo estadio, así como larvas de *Ph. trichodes* de tercer estadio, colectadas en el campo.

En la sección VII se profundiza en aspectos clave de esta cría.

2. Larvas de tercer estadio

El material colectado en parcelas del Estado de Tamaulipas y utilizado en el tercer bioensayo, estuvo representado por larvas de *Ph. trichodes*, en su mayoría del tercer estadio temprano del segundo año del ciclo de vida. Se lograron reunir un poco más del millar de ejemplares; poco más del 90% sobrevivió al traslado de la zona de colecta al laboratorio. En los primeros 10 días de mantenimiento a las condiciones de laboratorio, se presentaron pocas muertes. Se contaba con 1055 individuos sanos y con base en su buena apariencia externa, se seleccionaron las más resistentes.

De aquí surgieron las 252 larvas utilizadas en el bioensayo III.

Cuadro 3. Número de larvas de primer estadio, obtenidas y recuperadas a partir del cultivo de adultos de las diferentes especies de Melolonthidae que fueron colectadas en Cuernavaca, Morelos (Jardines del IBt-UNAM)

Especie	No. Adultos colectados	No. larvas obtenidas del cultivo de adultos (14-22 de julio 1998)	No. larvas sobrevivientes (23-30 de julio 1998)	Recuperación de larvas (%)
<i>Phyllophaga ravida</i>	97	143	112	78
<i>Anomala inconstans</i>	27	114	96	84
<i>Phyllophaga blanchardi</i> (morfoespecie chica)	110	23	23	100
<i>Phyllophaga blanchardi</i> (morfoespecie grande)	33	34	32	94
<i>Phyllophaga vetula</i>	18	22	22	100
<i>Anomala castaniceps</i>	61	1	1	100
<i>Cyclocephala mafafa</i>	6	3	3	100

VI.3. Bioensayo I

1. Mortalidad

Las larvas de primer estadio de *Ph. ravidia* y *A. inconstans* respondieron de manera similar a las cepas de *Bt* probadas en este primer bioensayo (Gráficas 1 y 2). Ambas especies de gallina ciega sólo mostraron una elevada mortalidad causada por la cepa IB477. El tiempo mínimo en que se presentó la diferencia significativa con respecto al control en la mortalidad fue de 9 días ($P<0.05$) para *A. inconstans* (Gráfica 2) y de 13 días ($P<0.05$) para *Ph. ravidia* (Gráfica 1). En ambos casos, fue posible también observar una tendencia que sugiere actividad tóxica de la cepa IB205, pero este tratamiento no presentó diferencias significativas con respecto al control. En este bioensayo fue notoria la elevada mortalidad del lote control de ambas especies de gallina ciega, ya que murieron 3 larvas de cada una de las especies (mortalidad cercana al 40%), al término del bioensayo, a los 14 días (Gráficas 1 y 2).

2. Índice de morbi-mortalidad

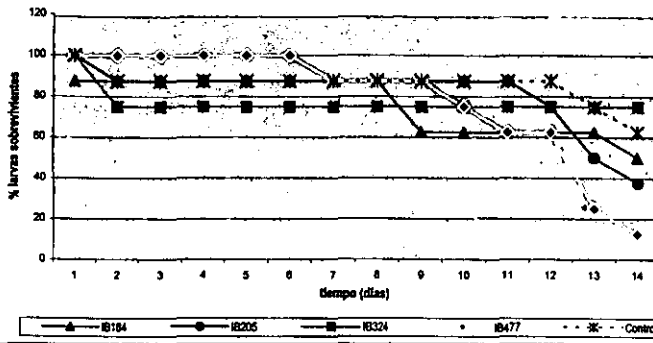
El índice de morbi-mortalidad representa la suma de los porcentajes de larvas vivas que presentaban coloración parduzca o ennegrecimiento perceptible y el porcentaje de larvas que murieron presumiblemente por dicho ennegrecimiento, provocado por *Bt* durante el bioensayo (propuesto por Calderón en 1998 y adaptado al presente trabajo). A diferencia del característico color ámbar que presenta el cuerpo de las larvas expuestas al ataque de *Serratia entomophila* (Calderón, 1998), la infección de una larva que ha ingerido los cristales tóxicos de *Bt* no presenta una sintomatología completamente definida. A pesar de ello, es posible distinguir algunos otros síntomas tales como anorexia y cierto ennegrecimiento del cuerpo del insecto, acompañado de un reblandecimiento del mismo.

Los patrones de morbi-mortalidad causada por *Bt* en el bioensayo I corroboran las diferencias observadas en la mortalidad entre los tratamientos y el lote control (Gráficas 3 y 4).

En este caso en particular, dicho índice refleja sólo la mortalidad, dado que no se presentaron larvas sobrevivientes con ennegrecimiento. Resalta el hecho de que al final del bioensayo, este índice fue significativamente mayor con respecto al control, alcanzando el 50% ($P<0.05$) en *Ph. ravidia* (Gráfica 3) y el 75% ($P<0.01$) en *A. inconstans* (Gráfica 4). Lo cual indica que en ambas especies el factor clave que determinó la diferencia significativa en la mortalidad entre el tratamiento IB477 y el control fue la actividad de *Bt*. Solamente en *A. inconstans*, la cepa IB205 provocó una diferencia significativa ($P<0.05$) en este índice con respecto al control (Gráfica 4). Algunas larvas de *Ph. ravidia* tratadas con la cepa IB205 presentaron ennegrecimiento.

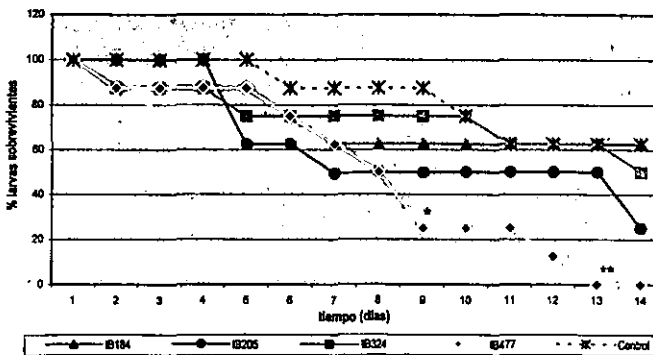
Gráfica 1. Supervivencia de larvas de *Ph. ravidus* de primer estadio a los 14 días del tratamiento de infección con 4 cepas de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo I

$n=8$ $\chi^2 P<0.05$ $\sim P<0.01$ $\sim X^2$

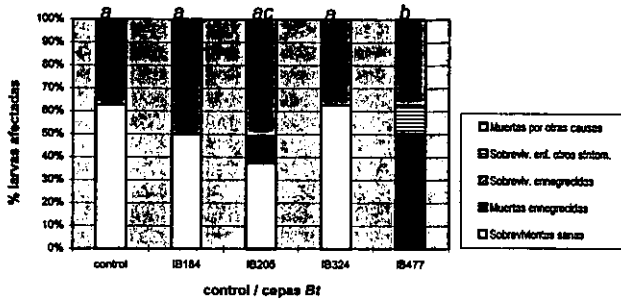


Gráfica 2. Supervivencia de larvas de *A. inconspicua* de primer estadio a los 14 días del tratamiento de infección con 4 cepas de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo I

$n=8$ $\chi^2 P<0.05$ $\sim P<0.01$ $\sim X^2$

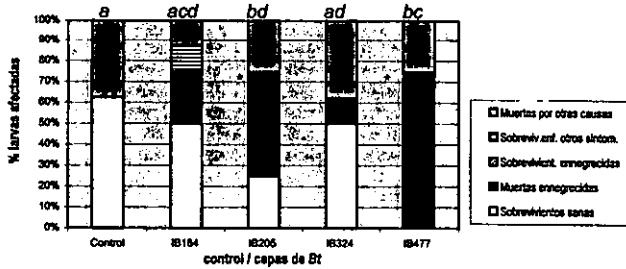


Gráfica 3. Porcentaje de larvas sobrevivientes de segundo estado de *Ph. ravidus*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes cepas utilizadas, después de 14 días del bioensayo I



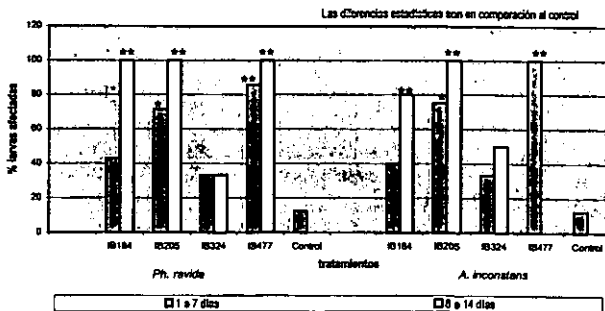
Letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos
 * = índice de morbi-mortalidad (IB477=50%)

Gráfica 4. Porcentaje de larvas de primer estado sobrevivientes de *A. inconstans*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes cepas utilizadas, después de 14 días del bioensayo I



Letras distintas representan diferencias significativas entre los tratamientos
 * = índice de morbi-mortalidad (IB477= 75% ; IB205= 50%)

Gráfica 5. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. ravidus* y *A. inconstans* de primer estado, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en dos intervalos de tiempo en el bioensayo I



A juzgar por este índice de morbi-mortalidad, en general la actividad tóxica de las cepas de *Bt* probadas se expresa mejor en las larvas de *A. inconstans* (Gráfica 4), en comparación con las de *Ph. ravidia* (Gráfica 3).

Las larvas del lote control que murieron no presentaron ennegrecimiento.

3. Anorexia

La inhibición de la alimentación (anorexia) proporcionó información adicional para explicar el efecto tóxico causado por los tratamientos en las larvas de ambas especies (Gráfica 5). Los resultados de anorexia, también reforzaron la presencia de actividad tóxica en la cepa IB477. Tanto en *Ph. ravidia* como en *A. inconstans* se observó un efecto significativo ($P < 0.01$) con respecto al control en la inhibición de la alimentación, que se manifiesta en el intervalo de 1 a 7 días (Gráfica 5). Es de llamar la atención que para ambas especies de gallina ciega se observó un efecto anoréxico significativo, provocado por la cepa IB205 tanto para el primer intervalo ($P < 0.05$), como para el segundo ($P < 0.01$). De la misma manera, la cepa IB184 mostró un efecto anoréxico significativo ($P < 0.01$) en ambas especies, pero sólo en el segundo intervalo de tiempo (8 a 14 días).

El patrón de anorexia, aparentemente es un criterio más sensible para la determinación de un efecto tóxico de cepas de *Bt*. Dicho patrón indicó que la cepa IB324 fue la menos tóxica de todas las cepas probadas para ambas especies de insectos (Gráfica 5).

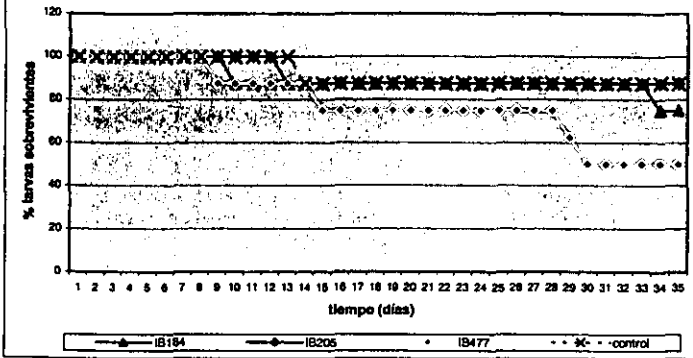
VI.4. Bioensayo II

1. Mortalidad

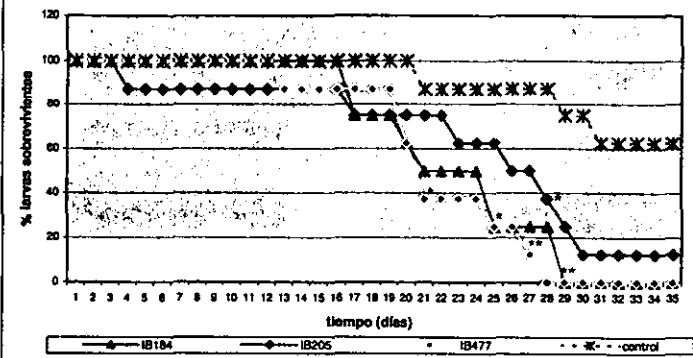
En este bioensayo la cepa IB477 se destacó nuevamente por su actividad tóxica. En larvas de tercer estadio de *A. inconstans*, esta cepa provocó una mortalidad significativamente superior a partir de los 21 días ($P < 0.05$) con respecto al control. A los 27 días ($P < 0.01$), sólo una larva sobrevivía (Gráfica 7). Así mismo, esta cepa fue la única que provocó una mortalidad significativa en larvas de tercer estadio de *Ph. trichodes*, a los 29 ($P < 0.05$) y a los 31 días de tratamiento ($P < 0.01$) con relación al control (Gráfica 8). Aparentemente las larvas de segundo estadio de *Ph. ravidia* también mostraron sensibilidad a la toxicidad de la cepa IB477, aunque esta susceptibilidad no se expresó estadísticamente en su mortalidad (Gráfica 6).

Ambas especies de *Phyllophaga* fueron resistentes a la actividad tóxica de las cepas IB184, IB205 e IB324 (Gráficas 6 y 8), y únicamente las larvas de *A. inconstans* resultaron también afectadas significativamente por la actividad de las cepas IB184 e IB205 (Gráfica 7). Con este segundo bioensayo se confirmó la inocuidad de la cepa IB324 tanto para larvas de *Ph. ravidia* como para larvas de *A. inconstans*.

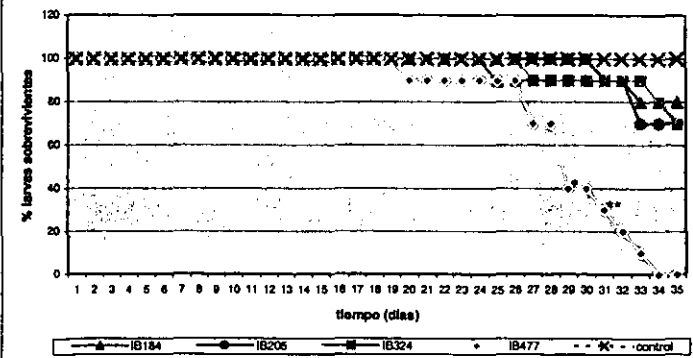
Gráfica 6. Sobrevivencia de larvas de *Ph. ravidus* de segundo estadio, a los 35 días del tratamiento de infección con 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo II $n=8$
 $\chi^2(P<0.05)$ $\chi^2(P<0.01)$ X2



Gráfica 7. Sobrevivencia de larvas de *A. inconstans* de tercer estadio, a los 35 días del tratamiento de infección con 3 cepas de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo II $n=8$
 $\chi^2(P<0.05)$ $\chi^2(P<0.01)$ X2



Gráfica 8. Sobrevivencia de larvas de *Ph. ichodius* de tercer estadio a los 35 días del tratamiento de infección con cepas de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo II $n=10$
 $\chi^2(P<0.05)$ $\chi^2(P<0.01)$ X2



Cabe destacar que todas las larvas del lote control de *Ph. trichodes* sobrevivieron, y sólo una del lote control de *Ph. ravidia* murió, después de 35 días de tratamiento (Gráficas 8 y 6).

Un aspecto importante en este bioensayo es que en los primeros 15 días no se presentaron resultados significativos de mortalidad, por lo que fue necesaria la aplicación de una segunda dosis de *Bt* para poder detectar la actividad biológica de las cepas probadas (Gráficas 6, 7 y 8).

2. Índice de morbi-mortalidad

Considerando el índice de morbi-mortalidad, la cepa que mejor funcionó fue nuevamente la IB477. A diferencia del bioensayo I, en este bioensayo aparecieron larvas sobrevivientes con ennegrecimiento en cada una de las especies de gallina ciega, después de 35 días. Esto fue particularmente conspicuo en larvas de tercer estadio de *A. inconstans*, en donde el índice de morbi-mortalidad alcanzó prácticamente el 90% (Gráfica 10). Con la cepa IB205 se obtuvo un índice significativo ($P < 0.05$) del 58.3% (Gráfica 10).

La cepa IB477 fue la única que provocó ennegrecimiento en larvas muertas y sobrevivientes de segundo estadio de *Ph. ravidia*, resultando con un índice significativo con respecto a los demás tratamientos ($P < 0.05$) del 50% (Gráfica 9). A juzgar por el índice de morbi-mortalidad, las larvas de tercer estadio de *Ph. trichodes* mostraron cierta sensibilidad a todas las cepas de *Bt* probadas, aunque la única con resultados significativos respecto al control ($P < 0.01$) fue la IB477, en donde destaca la gran cantidad de muertas y sobrevivientes con ennegrecimiento (70%). Las demás cepas presentaron un elevado número de larvas sobrevivientes sanas (Gráfica 11).

Nuevamente, según el índice de morbi-mortalidad de este bioensayo, son las larvas de *A. inconstans* las más sensibles a la actividad tóxica de las cepas de *Bt* (en especial a la IB477); las larvas de *Ph. trichodes* también lo fueron, aunque en menor grado. De los tratamientos control, ninguna larva de las que murieron presentó síntomas de ennegrecimiento (Gráficas 9, 10 y 11).

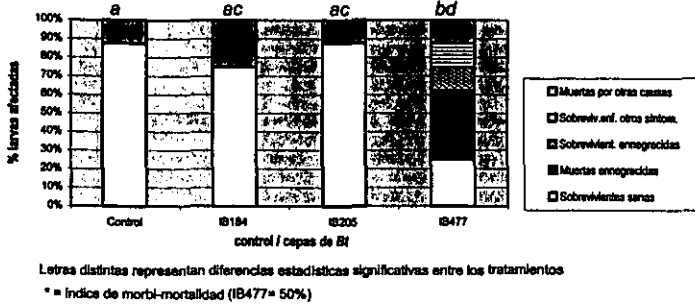
3. Anorexia

La cepa IB477 fue la que mejores resultados ofreció en este rubro, al presentar actividad anoréxica en contra de las 3 especies de gallina ciega. En contra de larvas de *Ph. ravidia*, se comenzaron a observar resultados significativos de anorexia respecto al control ($P < 0.01$) a partir del intervalo de 15 a 21 días con dicha cepa (Gráfica 12).

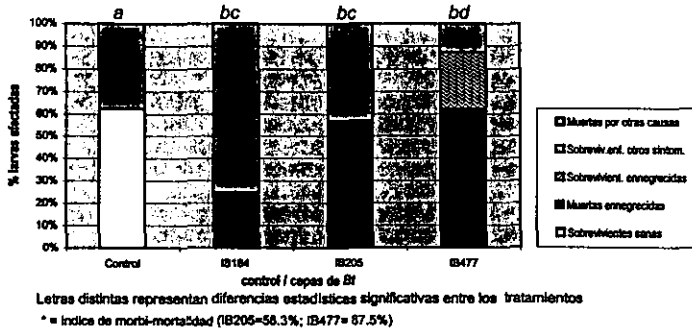
Con larvas de *A. inconstans*, esta cepa IB477 inició su actividad tóxica en los primeros 14 días de tratamiento, con diferencias significativas respecto al control ($P < 0.01$; Gráfica 13). En contra de larvas de *Ph. trichodes*, en el intervalo de 15 a 21 días se detectaron resultados significativos de anorexia, con relación al control ($P < 0.01$, Gráfica 14).

Las demás cepas utilizadas ofrecieron resultados significativos de anorexia ($P < 0.01$) a partir del intervalo de los 22 a los 28 días en larvas de *Ph. ravidia*, de los 15 a los 21 días en *A. inconstans* y a partir de los 22 días en *Ph. trichodes* (Gráficas 12, 13 y 14). Cabe mencionar que la cepa IB324 sólo fue utilizada contra larvas de *Ph. trichodes*, y alcanzó resultados significativos de anorexia con relación al control ($P < 0.05$, Gráfica 14).

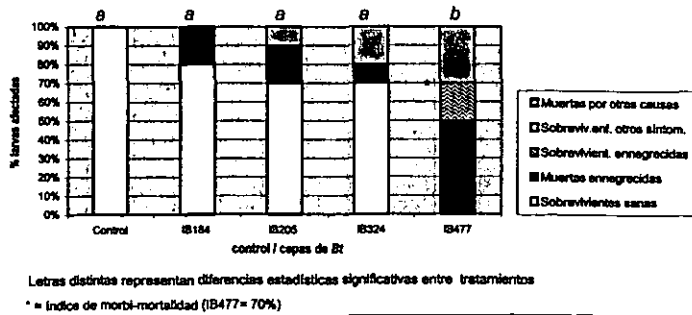
Gráfica 9. Porcentaje de larvas sobrevivientes de segundo estadio de *Ph. ravidia*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes cepas utilizadas, después de 35 días del bioensayo II $n=4$



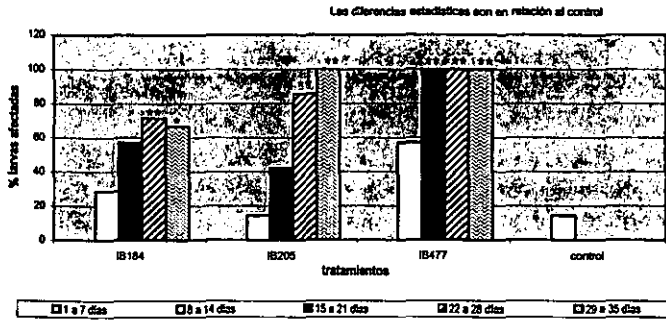
Gráfica 10. Porcentaje de larvas de tercer estadio sobrevivientes de *A. inconstans*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes cepas utilizadas, después de 35 días del bioensayo II $n=4$



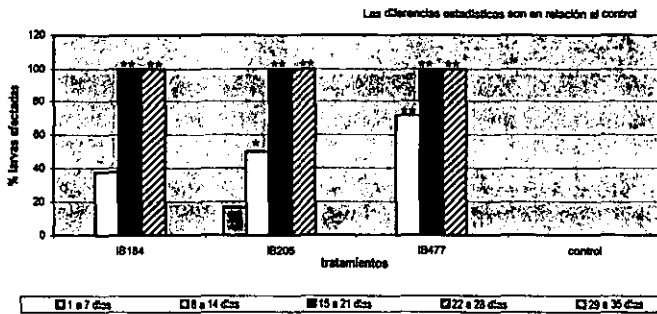
Gráfica 11. Porcentaje de larvas de tercer estadio sobrevivientes de *Ph. trichodes*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes cepas utilizadas, después de 35 días del bioensayo II $n=10$



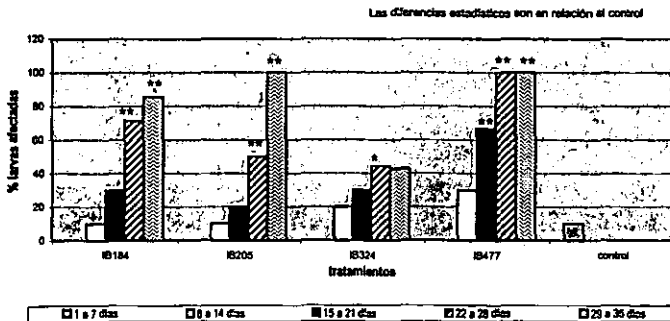
Gráfica 12. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. ravidus* de segundo estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo en el bioensayo II $n=8$ $P<0.05$ $P<0.01$ X^2



Gráfica 13. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *A. inconspicua* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo en el bioensayo II $n=8$ $P<0.05$ $P<0.01$ X^2



Gráfica 14. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. trichodes* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo en el bioensayo II $n=18$ $P<0.05$ $P<0.01$ X^2



VI.5. Bioensayo III

1. Mortalidad

La cepa KB92 fue la única que presentó resultados significativos de mortalidad respecto al control, con todas las concentraciones utilizadas, destacando la c1 (concentración 10,000 ng/ml) a los 19 días ($P<0.05$) y a los 20 días ($P<0.01$) del bioensayo (Gráfica 15). Sobrevivieron únicamente 16 de las 60 larvas tratadas con esta cepa, después de 30 días de tratamiento, lo que representa el 26.6% del total (Cuadro 4).

La cepa IB209, utilizada en la proporción espora:cristal 1:7, fue la primera en presentar una mortalidad significativa respecto al control ($P<0.05$). Esto ocurrió a los 18 días del bioensayo, con la c1. Sólo con la c4 y la c5 no se presentaron resultados significativos estadísticamente en este rubro (Gráfica 17). Después de la cepa KB92, la cepa IB209 a dicha proporción espora:cristal fue la que provocó una mayor mortalidad de larvas (33 en total), lo que representa el 55% del total de utilizadas en este tratamiento (Cuadro 4).

Para la misma cepa IB209, pero a una proporción espora:cristal 1:1, se presentaron resultados significativos de mortalidad respecto al control sólo hasta los 22 ($P<0.05$) y 23 días ($P<0.01$) con la c1, y con la c2 hasta los 24 ($P<0.05$) y 27 días del bioensayo ($P<0.01$) (Gráfica 18). También es notable el hecho de que con esta proporción 1:1 se obtuvieron resultados de mortalidad significativos con relación al lote control ($P<0.05$) con la c5 a los 30 días del bioensayo.

Con las c3 y c4 no se observaron resultados significativos (Gráfica 18). En total, con esta mezcla espora:cristal se presentaron 33 larvas muertas (Cuadro 4).

La cepa IB293 sólo mostró resultados significativos de mortalidad con relación al control con la c1 ($P<0.01$) a los 24 días, y con la c2 ($P<0.01$) a los 27 días del bioensayo. Con las demás concentraciones no se observó ninguna mortalidad significativa (Gráfica 16). Se trató de la cepa con la cifra más baja de larvas muertas al final del bioensayo (24 en total), lo que representa una sobrevivencia del 60% (Cuadro 4).

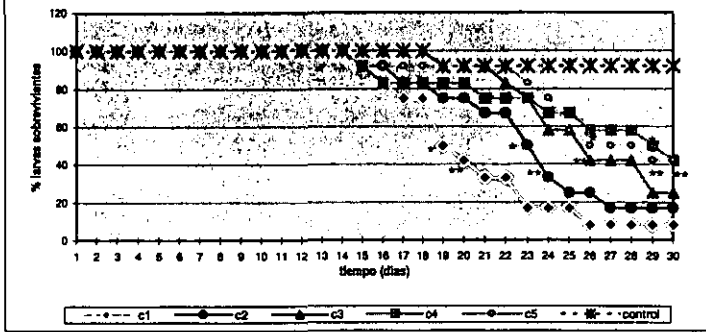
Un aspecto fundamental en el bioensayo fue que el lote control presentó una mortalidad muy baja (8.3%), lo que permitió obtener diferencias significativas con respecto a los tratamientos.

La única larva muerta de este lote se detectó hasta los 19 días, sin ningún síntoma de enfermedad (Gráficas 15, 16, 17 y 18; Cuadro 4).

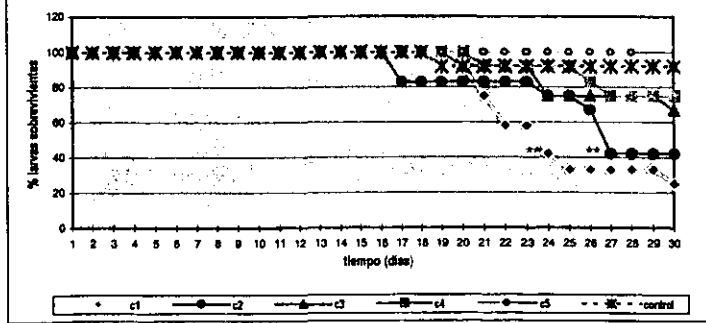
Cuadro 4. Resultados obtenidos en cada rubro de evaluación, al probar las cepas de *Bacillus thuringiensis* en distintas concentraciones, en contra de larvas de tercer estadio de *Ph. trichodes* después de 30 días del bioensayo III.

Cepa y Concentración	No. larvas sobreviv. sanas	No. larvas sobreviv. enfermas	No. larvas muertas	Sobreviv. (%)	Índice morbi-mortalidad (%)	Anorexia promedio cada 7 días de tratamiento (%)
Lote Control	11	0	1	91.6	0	0
KB92						
c1 (10,000 ng/ml)	0	1	11	8.33	83.33	58.35
c2 (1,000 ng/ml)	2	0	10	16.66	66.66	52.07
c3 (100 ng/ml)	1	2	9	25	50	46.77
c4 (10 ng/ml)	2	3	7	41.66	58.33	46.5
c5 (1 ng/ml)	4	1	7	41.66	41.66	40.5
promedio	—	—	—	26.66	59.99	48.83
total	9	7	44	—	—	—
IB209 (1:7)						
c1 (10,000 ng/ml)	1	2	9	25	66.66	83.35
c2 (1,000 ng/ml)	1	3	8	33.33	58.33	62.5
c3 (100 ng/ml)	3	3	6	50	58.33	50.6
c4 (10 ng/ml)	5	2	5	58.33	50	48.87
c5 (1 ng/ml)	4	3	5	58.33	50	50.92
promedio	—	—	—	44.99	58.66	59.24
total	14	13	33	—	—	—
IB209 (1:1)						
c1 (10,000 ng/ml)	2	0	10	16.66	66.66	51.2
c2 (1,000 ng/ml)	2	1	9	25	66.66	45.12
c3 (100 ng/ml)	4	4	4	66.66	33.33	51.37
c4 (10 ng/ml)	5	3	4	66.66	41.66	37.5
c5 (1 ng/ml)	3	3	6	50	41.66	46.42
promedio	—	—	—	44.99	44.99	46.32
total	16	11	33	—	—	—
IB293						
c1 (10,000 ng/ml)	2	1	9	25	58.33	63.88
c2 (1,000 ng/ml)	1	4	7	41.66	66.66	56.67
c3 (100 ng/ml)	3	5	4	66.66	41.66	52.32
c4 (10 ng/ml)	9	0	3	75	16.66	36
c5 (1 ng/ml)	9	2	1	91.66	16.66	31.25
promedio	—	—	—	59.99	39.99	48.02
total	24	12	24	—	—	—

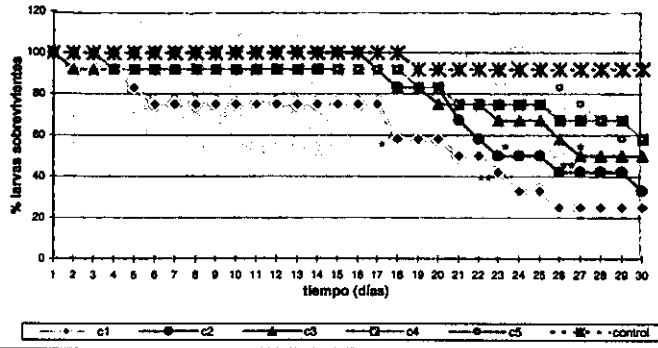
Gráfica 15. Supervivencia de larvas de *Ph. trichodes* de tercer estadio, a los 30 días de infección con la cepa KB92 de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo III n=12
 *-(P<0.05)-(P<0.01)-**



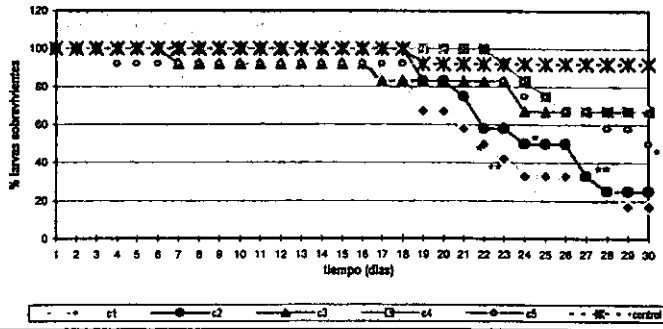
Gráfica 16. Supervivencia de larvas de *Ph. trichodes* de tercer estadio, a los 30 días de infección con la cepa B283 de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo III n=12
 *-(P<0.05)-(P<0.01)



Gráfica 17. Sobrevivencia de larvas de *Ph. trichodes* de tercer estado, a los 30 días de infección con la cepa IB209 (proporción esporocristal 1:7) de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo III $n=12$ $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$



Gráfica 18. Sobrevivencia de larvas de *Ph. trichodes* de tercer estado, a los 30 días de infección con la cepa IB209 (proporción esporocristal 1:1) de *Bacillus thuringiensis* en el bioensayo III $n=12$ $^{*}P<0.05$ $^{**}P<0.01$ $^{***}P<0.001$



2. Índice de morbi-mortalidad

La cepa KB92 indujo el índice de morbi-mortalidad más alto de este bioensayo (83.3%), significativamente mayor con relación al lote control ($P<0.01$) con la c1 (Gráfica 19). Así mismo, presentó el menor número de larvas sobrevivientes sanas de todas las cepas utilizadas (9), lo que representa tan sólo el 15% del total (Cuadro 4).

Junto con la cepa IB209 en su modalidad espora:cristal 1:7, fueron las únicas en las que las 5 concentraciones manejadas para cada cepa presentaron resultados de morbi-mortalidad significativos respecto al control ($P<0.01$ y $P<0.05$), sin observarse resultados significativos entre dichas concentraciones, lo que sugiere que todas expresaron la actividad tóxica de *Bt* por la manera en que provocaron ennegrecimiento y muertes de las larvas de *Ph. trichodes* (Gráficas 19 y 21). Al promediar los índices de morbi-mortalidad obtenidos de las 5 concentraciones de cada una de las cepas, se observó que la cepa KB92 alcanzó un 59.99%, el índice promedio más alto del bioensayo (Cuadro 4).

Utilizando la cepa IB209 (1:7), se observaron síntomas de ennegrecimiento importantes, tanto de larvas muertas como de sobrevivientes ennegrecidas. Fue así como se obtuvieron índices de morbi-mortalidad significativos respecto al control: el máximo un 66% ($P<0.01$) con la c1, y el más bajo un 50% ($P<0.05$) con la c5 (Gráfica 21; Cuadro 4). De las 60 larvas tratadas, sobrevivieron 14 en buen estado, sin síntomas de infección por *Bt*, lo que representa un 23.3%. Después de la cepa KB92, fue la cepa con el índice promedio más elevado (56.64%), en 30 días de tratamiento (Cuadro 4).

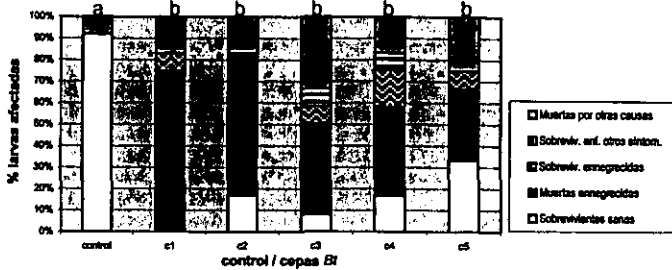
Por otro lado, en su modalidad espora:cristal 1:1, la cepa IB209 presentó el segundo dato más alto de muertes ennegrecidas (8) en un solo tratamiento, lo que se reflejó en un índice de morbi-mortalidad del 66.6% con la c1; este índice tomó como base únicamente las larvas muertas ennegrecidas, ya que no se detectaron sobrevivientes con síntomas de ennegrecimiento (Gráfica 22; Figura 8; Cuadro 4). Se registraron 16 larvas sobrevivientes sanas (casi el 27% del total), además de que la c4 no ofreció resultados de morbi-mortalidad significativos respecto al control (Cuadro 4).

Así mismo, se observó un índice promedio menor al 50%, similar al obtenido con la otra mezcla espora:cristal (1:7) (Cuadro 4).

La cepa IB293 fue la que menos resultados ofreció en este rubro, ya que a pesar de alcanzar índices de morbi-mortalidad del 58.3% con la c1, y de 66% con la c2, cifras significativamente mayores respecto al control ($P<0.01$), con la c4 y la c5 no se alcanzó ni siquiera un índice del 20%. Así mismo, resultó con un índice promedio apenas del 39.9%, reflejándose en datos no significativos respecto al control (Gráfica 20; Cuadro 4). Además, fue la cepa que más larvas sobrevivientes sanas registró (24 en total), lo que representa un 40% del total (Cuadro 4).

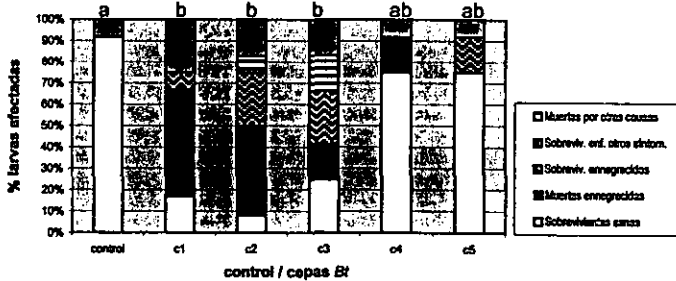
En lo que respecta al lote control, la larva que murió en el transcurso del bioensayo no presentó ennegrecimiento alguno (Gráficas 19, 20, 21 y 22; Cuadro 4).

Gráfica 19. Porcentaje de larvas sobrevivientes de tercer estado de *Ph. trichodes*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes concentraciones de la cepa KB92 de *Bacillus thuringiensis*, después de 30 días de tratamiento
 Bioensayo III n=12



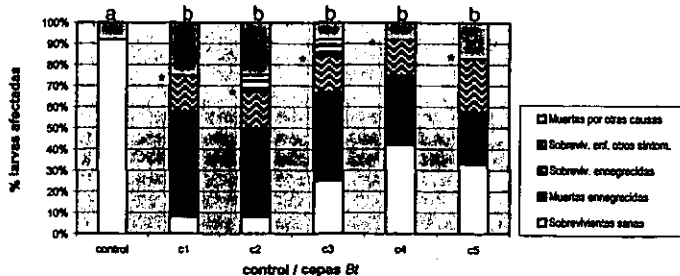
Letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos
 * = índice de morbi-mortalidad (c1=83.3%; c2=66.6%; c3=50%; c4=58.3%; c5=41.6%)

Gráfica 20. Porcentaje de larvas sobrevivientes de tercer estado de *Ph. trichodes*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes concentraciones de la cepa B293 de *Bacillus thuringiensis*, después de 30 días de tratamiento
 Bioensayo III n=12



Letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos
 * = índice de morbi-mortalidad (c1=58.3%; c2=66.6%; c3=41.6%)

Gráfica 21. Porcentaje de larvas sobrevivientes de tercer estado de *Ph. trichodes*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes concentraciones de la cepa B209 (1:7) de *Bacillus thuringiensis*, después de 30 días de tratamiento
 Bioensayo III n=12



Letras distintas representan diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos
 * = índice de morbi-mortalidad (c1=68.6%; c2=58.3%; c3=58.3%; c4=50%; c5=50%)

Gráfica 22. Porcentaje de larvas de tercer estadio sobrevivientes de *Ph. trichodes*, agrupadas por categorías de salud para las diferentes concentraciones de la cepa IB209 (1:1) de *Bacillus thuringiensis*, después de 30 días de tratamiento

Bioensayo III n=12

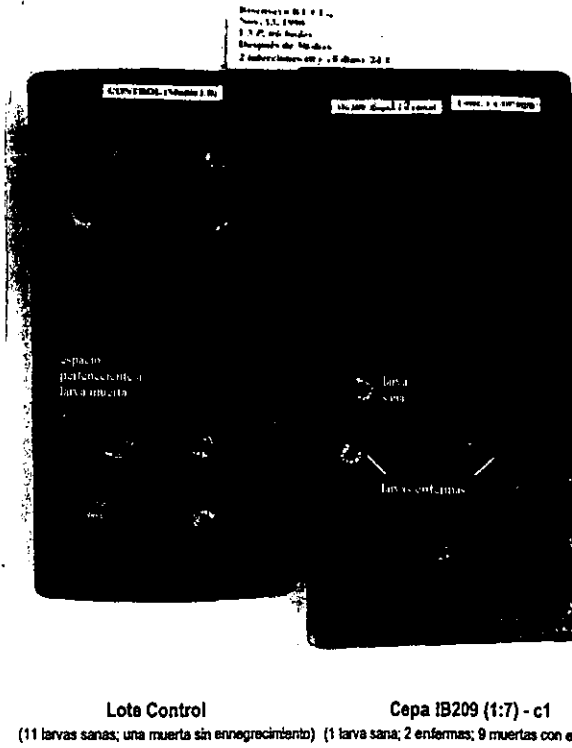
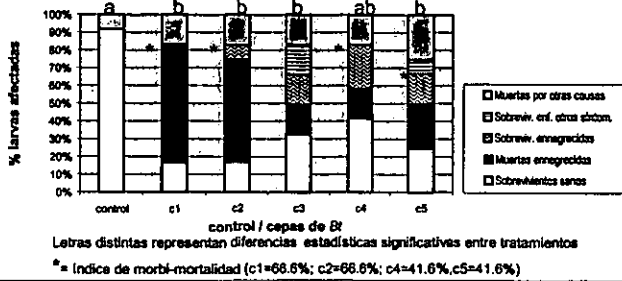


Figura 8. Comparación de la apariencia corporal externa de larvas de *Ph. trichodes* del lote Control respecto a larvas infectadas con la cepa IB209 (1:7) de *Bacillus thuringiensis*, a una concentración de 10,000 ng/ml (c1). Resultados de Morbi-mortalidad a los 30 días del Bioensayo III.

3. Anorexia

La cepa KB92 provocó anorexia tardía en las larvas de *Ph. trichodes*, esto es, después de los primeros 15 días de tratamiento. Hasta entonces se registraron resultados significativos de anorexia respecto al control ($P < 0.01$) con todas las concentraciones (Gráfica 23). Esto coincidió con el período en que la mortalidad aumentó rápidamente, lo que sugiere que esta cepa es letal en dosis bajas, sin necesidad de provocar efectos colaterales como la anorexia. Lo anterior quedó de manifiesto al comparar el promedio de anorexia que presentó en cada intervalo de tiempo (48.8%), con el promedio de la cepa IB209 (1:7) cercano al 60%. Fue el único rubro en el cual la cepa *Buibui* se vió superada (Cuadro 4).

Al utilizar la cepa IB209 (1:7), se observó un efecto anoréxico temprano. En este sentido fue la única que alcanzó niveles significativos en el primer intervalo de tiempo; durante los primeros 7 días del bioensayo ya se contaba con resultados significativos de anorexia respecto al control con todas las concentraciones ($P < 0.01$).

Esto indica que a pesar de que una sola dosis de bacteria no era suficiente para provocar la muerte de la gallina ciega de esta especie, si lo era para desencadenar los primeros síntomas de la infección por *Bt* (Gráfica 25). Como ya se mencionó, fue la cepa que en promedio presentó el porcentaje de anorexia más alto (59.25%) al término del bioensayo (Cuadro 4).

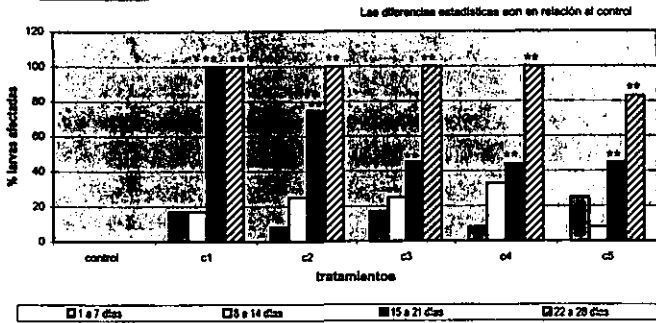
En cambio, con la modalidad spora:cristal 1:1 de esta cepa se observó un efecto anoréxico tardío, en el intervalo de 15 a 21 días del bioensayo. Todas las concentraciones registraron datos de anorexia significativos con relación al control ($P < 0.01$), en este intervalo de tiempo (Gráfica 26). Se presentó un porcentaje de anorexia del 46.32% (Cuadro 4).

Dando muestras de toxicidad, la cepa IB293 provocó un efecto anoréxico temprano, sobre todo con la c1 y la c3, con resultados significativos con relación al control ($P < 0.05$). Pero fue en realidad en el intervalo de 15 a 28 días cuando se observó un incremento importante en la anorexia de las larvas respecto al control ($P < 0.01$), excepto con c4 y c5 (Gráfica 24).

A pesar de no ser la cepa más efectiva en el experimento, en este rubro alcanzó una anorexia promedio similar a la de la cepa KB92 al final del bioensayo (Cuadro 4).

Por último, ninguna de las larvas sobrevivientes del lote control registraron síntomas de anorexia durante el bioensayo (Gráficas 23, 24, 25 y 26; Cuadro 4).

Gráfica 23. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. trichodes* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo, al ser tratadas con la cepa KB92 de *Bacillus thuringiensis* Bioensayo III $n=12$
 $p=0.03$ $p=0.01$ $p=0.02$

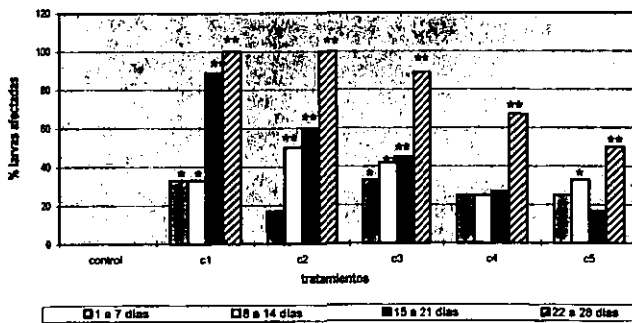


Gráfica 24. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. trichodes* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo al ser tratadas con la cepa IB293 de *Bacillus thuringiensis*

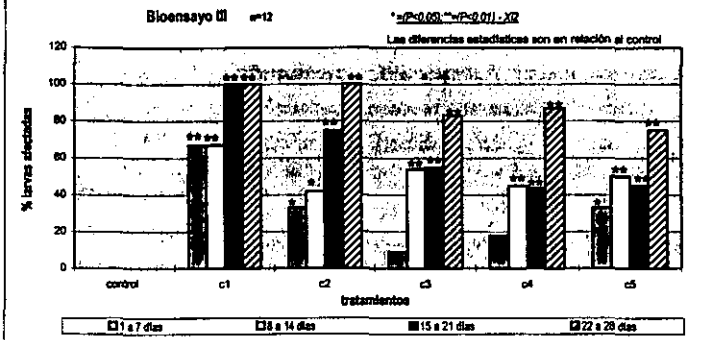
Bioensayo III $n=12$

$p=0.03$ $p=0.01$ $p=0.02$

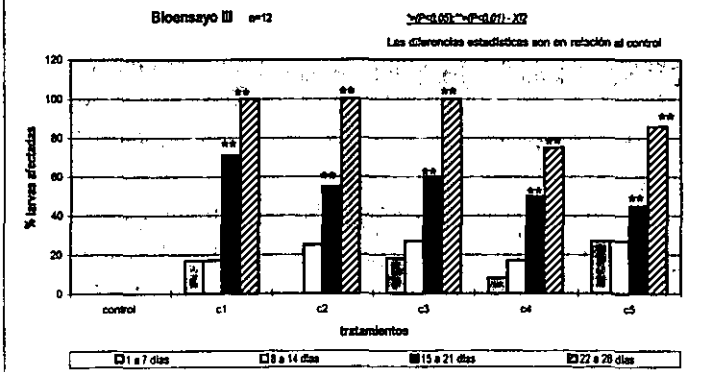
Las diferencias estadísticas son en relación al control



Gráfica 25. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. trichodes* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo al ser tratadas con la cepa IB209 (1:7) de *Bacillus thuringiensis*



Gráfica 26. Porcentaje de larvas sobrevivientes de *Ph. trichodes* de tercer estadio, que presentaron anorexia durante 7 días consecutivos en diferentes intervalos de tiempo al ser tratadas con la cepa IB209 (1:1) de *Bacillus thuringiensis*

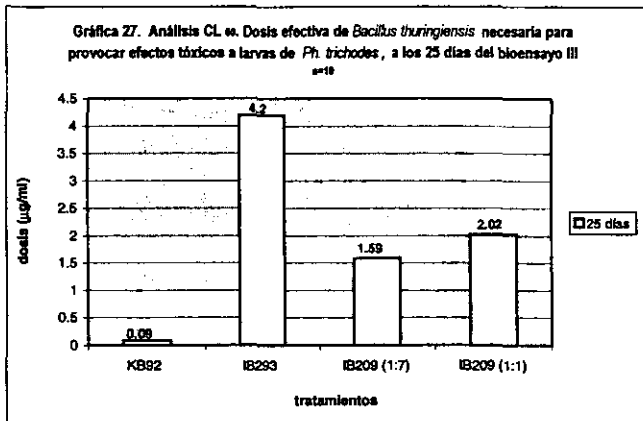


4. CL₅₀

Al realizar el análisis PROBIT CL₅₀ correspondiente, se observó que la cepa control KB92 registró el valor de CL₅₀ más bajo de todos (0.09 µg/ml) después de 25 días, es decir, que en condiciones de laboratorio se requieren de 0.09 µg de esta cepa para provocar toxicidad en larvas de *Ph. trichodes* (Gráfica 27).

Después de la cepa *Buibui*, se consideró a la modalidad espora:cristal 1:7 de la cepa IB209 como la más tóxica en contra de larvas de *Ph. trichodes*. Después de 25 días de bioensayo, registró un valor CL₅₀ de 1.6 µg/ml. (Gráfica 27). La modalidad espora:cristal 1:1 de esta cepa, presentó un valor CL₅₀ de 2.0 µg/ml, muy parecido al registrado en la modalidad 1:7 (Gráfica 27). Este dato es fiel reflejo de lo observado en la mayoría de los parámetros de este bioensayo, en donde ambas proporciones espora:cristal de la cepa IB209 ofrecieron resultados que sugieren que las larvas de *Ph. trichodes* son altamente susceptibles a su actividad tóxica.

En contraparte, el valor CL₅₀ para la cepa IB293 (4.2 µg), la ubicó como la menos tóxica de todas las cepas probadas en este bioensayo (Gráfica 27).



VII. DISCUSIÓN

VII.1. Bioensayos

1. Mortalidad

Bioensayos I y II

En los primeros dos bioensayos se probaron cepas de las cuales no se tenían reportes de su actividad tóxica, y sólo se contaba con una caracterización parcial de sus particularidades moleculares (presencia de genes *cry8* en sus secuencias). En la actualidad continúan caracterizándose (Núñez-Valdez, com. pers.).

Después de evaluar la actividad tóxica de las cuatro cepas de *Bt* utilizadas en los primeros dos bioensayos, fue evidente la vulnerabilidad de las larvas de primer y tercer estadio de *Anomala inconstans*, y las de tercer estadio de *Phyllophaga trichodes* a la cepa IB477. Esta cepa no había sido probada con anterioridad, y por ello se desconoce aún la causa precisa por la que provocó una mortalidad tan alta en estas especies de gallina ciega. Así que deberá corroborarse en futuros estudios su actividad tóxica y profundizar en el conocimiento de sus mecanismos de acción.

Según el análisis por PCR, tanto la cepa IB477 como la IB205 presentan productos de PCR específicos para *cry8C*. Los productos de estos genes ofrecen actividad tóxica en contra de coleópteros de Melolonthidae (Ogiwara et al., 1995 en Barreda, 2000), lo cual permitía suponer que ambas cepas contaban con el potencial para provocar la muerte en las larvas inoculadas.

Al efectuar la electroforesis en gel de los productos PCR con oligonucleótidos para genes *cry8*, se observó un arreglo de sus bandas muy parecido, lo que indicaba que probablemente se trataba de cepas genéticamente parecidas (sección VI.1., punto 1). Esta situación sugería que su actividad tóxica sería también similar, pero la cepa IB477 fue la que resultó más tóxica. Lo anterior sugiere también que, aún cuando dos cepas presenten productos de PCR similares, no necesariamente presentan una misma actividad biológica.

A pesar de que las cepas IB205 e IB477 resultaron efectivas en especial contra larvas de *A. inconstans*, y a pesar de su similitud, la cepa IB205 presentó una efectividad menor en el rubro de la mortalidad. Incluso se observaron diferencias estadísticas significativas al comparar los resultados de ambas, sobre todo en el bioensayo II (Gráficas 6, 7 y 8).

En el bioensayo I, esta cepa también provocó una menor mortalidad respecto a la cepa IB477, aunque sin diferencias significativas entre sus resultados de mortalidad (Gráficas 1 y 2). Sin embargo, es evidente que habrá que darle un seguimiento a su actividad y corroborar sus efectos en contra de gallinas ciegas, incluso de otras especies.

Se observó también que la actividad de la cepa IB184 fue sumamente inconsistente, y la cepa IB324, resultó prácticamente inofensiva contra estos insectos.

Ahora bien, según el análisis por PCR, tanto IB184 como IB324 contienen en su estructura genes tipo *cry8*, y aunque esto no es garantía de toxicidad, sí permite considerarlas como cepas tóxicas potenciales. Probablemente su actividad está dirigida hacia otras especies de Melolonthidae, aunque es difícil pensar en corroborar su actividad en un futuro, sobre todo porque no justifican la aplicación de nuevos análisis de su secuencia genética. Lo mejor en estos casos es enfocar los esfuerzos en nuevas cepas potenciales de *Bt*.

La selección de las cepas de *Bt* a probar en los primeros dos bioensayos se realizó con base en sus productos de PCR obtenidos en análisis anteriores (sección VI.1.; punto 1). De acuerdo a lo observado en el presente estudio, tanto la cepa IB477 como la cepa IB205 podrían ser ya consideradas como candidatas para incluirlas como estrategia de manejo en contra de especies de Melolonthidae con importancia económica en México.

En lo referente a las larvas de Melolonthidae empleadas en los primeros dos bioensayos, se consideró adecuado el uso de estadios tempranos en su mayoría. Esto por la rapidez con la que se obtienen en una cría y principalmente, porque en varios reportes del Japón se ha comprobado la viabilidad de un bioensayo con este esquema.

Susuki et al. (1994) probaron la toxicidad de *Bt* serovar *japonensis* (cepa *Buibui*) en primeros y segundos estadios de *Anomala cuprea*, y observaron que esta cepa era muy efectiva para gallinas ciegas en esta etapa de su ciclo vital. Esto coincide con lo observado en nuestros dos primeros bioensayos, ya que las larvas de primer estadio, y las que alcanzaron el segundo, fueron susceptibles a la actividad de *Bt*, en particular a la cepa IB477.

Por otro lado, Susuki et al. (1994) también probaron la eficacia de esta cepa *Buibui* en contra de larvas de tercer estadio de *A. cuprea*. Encontraron que la efectividad de la bacteria es menor en esta etapa larval, que si se prueba en primeros y segundos estadios de la misma especie de este insecto. Alm et al. (1997), comprobaron que los terceros estadios de gallina ciega presentan dificultad en su manejo; utilizaron la cepa *Buibui* en contra de larvas de tercer estadio de *Exomala orientalis* y *Popillia japónica*, con resultados poco alentadores. En nuestro bioensayo II, se presentó algo similar con las larvas de *Ph. trichodes* y *A. inconstans* al probarlas con todas las cepas, excepto con la IB477. Esta cepa provocó una mortalidad alta independientemente de la edad de la larva.

Sin considerar el caso excepcional de la cepa IB477, y con base en Susuki et al. (1994), es posible que los estadios tempranos de las larvas resulten más susceptibles a un ataque bacteriano que los estadios avanzados. El utilizar estos insectos en sus primeras etapas de desarrollo, ofrece algunas ventajas, como el agilizar su cría para la realización de pruebas en el laboratorio, y sobre todo, para iniciar el diseño de ciertas estrategias de manejo específicas, como el uso de *Bt* en condiciones de campo. Una de estas estrategias podría ser el evitar que la gallina ciega ataque un cultivo de importancia económica, conociendo en primer término el ciclo de vida del insecto.

Así podría instrumentarse un programa de manejo sustentable con *Bt* en el momento preciso en que las larvas se encuentran en los primeros estadios larvales. De esta manera se evitaría que alcanzaran el tercer estadio, que presumiblemente es cuando se dificulta más su manejo.

Por otro lado, el tiempo mínimo de sobrevivencia que presentaron las larvas de *A. inconstans* y *Ph. ravidia* al ser tratadas con la cepa IB477 (14 días) en el bioensayo I, podría considerarse como un elemento importante de virulencia. En este sentido, el tiempo que transcurre entre el inicio de la exposición a un tóxico o tratamiento, y la evaluación de la respuesta influye en el tipo y grado de esta última. La exposición puede ser continua o puede establecerse un periodo limitado de exposición, seguido de un periodo de recuperación que tiene una duración suficiente para que se establezca la respuesta (Champ & Dyte, 1976 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

El tiempo de exposición depende del tipo de bioensayo y también de las características de la acción del insecticida; por ejemplo, 6 hrs. en ensayos de insecticidas convencionales con *Plutella xylostella* (Magaro & Edelson, 1990 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994), varias semanas en ensayos de huevecillos de curculiónidos con hongos entomopatógenos (Poprawski et al., 1985 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994) y de 2 a 4 días en bioensayos de *Oxythyrea funesta* con *Bt* (Robert et al., 1994).

En el presente trabajo, los primeros resultados de actividad tóxica por parte la cepa IB477 se presentaron entre los 9 y los 13 días en el primer bioensayo (Gráficas 1 y 2), y entre los 20 y los 27 días en el segundo bioensayo para las tres especies de larvas utilizadas (Gráficas 6, 7 y 8).

Con el lote control, destacó el hecho de que en el bioensayo I se presentó una mortalidad elevada. Puede inferirse que esta situación se debió en gran parte a haberse trabajado con primeros estadios, los cuales son altamente susceptibles a cualquier tipo de agresión, al igual que sucede en su etapa de pupa (Villalobos y Morón, com. pers.).

Los resultados obtenidos en este bioensayo se pueden considerar representativos estadísticamente hablando, ya que a pesar del reducido tamaño de muestra y de la elevada mortalidad del lote control, es clara la diferencia estadística al analizar los resultados del control contra las cepas de *Bt*, aplicando pruebas de contingencia de χ^2 (Delgado, com. pers.).

Bioensayo III

Para el bioensayo III se utilizaron cepas ya caracterizadas, de las cuales se tenía un mayor conocimiento en lo referente a su actividad tóxica. Fue así como se determinó la CL_{50} de cada una de ellas, cambiando sustancialmente el diseño del experimento respecto a los dos primeros bioensayos. Las cepas IB209, IB293 y KB92, además de la cepa IM22.a (no utilizada en este caso), ya habían sido probadas con anterioridad (Villalobos et al., resultados no publicados), por lo que se procedió a corroborar su actividad tóxica en este bioensayo. Así se ha detectado que la cepa KB92 (*Buibui*) presenta una importante toxicidad en contra de larvas de Melolonthidae de especies mexicanas, siendo el primer reporte de este tipo para nuestro país.

En el Japón, se ha encontrado que esta cepa es activa en contra de larvas de escarabajos tales como *Anomala cuprea* Hope, *A. albopilosa* Hope, *A. rufocuprea* Motschulsky y *Popillia japonica* Newman, y sus genes *cry* ya han sido clonados y secuenciados en su totalidad (Ohba et al., 1992; Susuki et al., 1992 en Alm et al., 1997). De la misma manera, la cepa *Buibui* ha dejado constancia de su efectividad sobre todo al utilizarse en bioensayos con primeros y segundos estadios de larvas de Melolonthidae (Susuki et al. 1994).

En contra de terceros estadios, los resultados en mortalidad son menos conspicuos; sin embargo, en algunos casos pueden alcanzar el 100%. Susuki et al. (1992) encontraron una mortalidad que oscilaba entre el 63 y el 100% en larvas de tercer estadio de *Anomala rufocuprea* y *A. shonfledi* Ohaus, al ser tratadas con *Bt* serovar *japonensis* a los 21 días de bioensayo (en Alm et al., 1997). En cambio, al utilizar la cepa *Buibui* en contra de terceros estadios de *A. cuprea*, se obtuvo una mortalidad del 48%, aunque fue significativa respecto al control (Susuki et al., 1994).

En el presente trabajo, al utilizar la cepa KB92 en contra de larvas de tercer estadio de *Phyllophaga trichodes*, se obtuvo una mortalidad del 73.3% después de 30 días de tratamiento (Cuadro 4). La mayoría de los reportes en este sentido se refieren exclusivamente a la susceptibilidad en larvas del género *Anomala*, encontrándose muy poca información referente a otros géneros, como el caso de *Phyllophaga*. Por lo tanto, es posible que esta cepa cuente con un espectro de acción más amplio y resulte tóxica contra especies de escarabajos con importancia económica, en especial, que sea efectiva contra especies mexicanas.

En el futuro, habrá que profundizar en la viabilidad del uso de esta cepa para el manejo de la gallina ciega, ya que a pesar de que los resultados de este trabajo son alentadores, el ataque de la cepa *Buibui* se ha enfocado a especies del género *Anomala*. Como es sabido, los representantes de este género no tienen importancia económica ni hábitos rizofágicos (Morón, et al., 1997), y normalmente los daños en los cultivos agrícolas son provocados por otros géneros de Melolonthidae, como *Phyllophaga*. Por lo tanto, al encontrar en nuestro estudio una mortalidad importante en larvas de *Phyllophaga* como resultado de la actividad de la cepa *Buibui*, se abren nuevas perspectivas en esta línea de investigación.

Por lo que respecta a la cepas IB209 e IB293, cabe señalar que no se cuenta con reportes que hagan referencia de su actividad tóxica contra larvas de Melolonthidae. Así que los valores de toxicidad obtenidos en este trabajo (notables para la cepa IB209 en sus dos mezclas espora:cristal, y bajos para la cepa IB293), pueden ser la base para futuros estudios.

2. Índice de Morbi-mortalidad y Anorexia

En ambos rubros de evaluación, no se cuenta con ningún reporte específico sobre *Bt* mediante el cual se establezcan puntos de comparación con lo observado en el presente estudio. Este es el primer reporte en el manejo de otros parámetros diferentes a la mortalidad, para la evaluación de actividad tóxica de *Bt* en contra de larvas de Melolonthidae.

En el caso de la morbi-mortalidad, se trata de un modelo de evaluación que propuso Calderón (1998), que permite integrar el número de organismos muertos o infectados con la sintomatología de la enfermedad bacteriana, en un bioensayo de infección. El objetivo en dicho estudio era evaluar la toxicidad de la bacteria entomopatógena *Serratia entomophila* en larvas de Melolonthidae. Esta bacteria ha sido empleada con éxito a una escala comercial, para el control del escarabajo del pasto *Costelytra zealandica* (White) en pastizales mejorados de Nueva Zelandia (Jackson et al., 1993). *S. entomophila* provoca en las gallinas ciegas una enfermedad conocida como "enfermedad ambarina", ya que las larvas infectadas adquieren una coloración ámbar en su cuerpo.

En el caso de *Bt*, tomando como base las observaciones de Sharpe (1976) y Villalobos (obs. pers.), se ha considerado que en las larvas infectadas precisamente con esta bacteria, se presenta una coloración café rojiza, o en algunos casos, un ennegrecimiento parcial o total de su cuerpo.

El índice de morbi-mortalidad utilizado por Calderón (1998) es un índice específico para la evaluación de la actividad tóxica de *Serratia*, y serviría como base para futuros trabajos con esta bacteria en particular.

El índice utilizado en nuestro estudio, podría ser un antecedente muy útil para próximas evaluaciones de nuevas cepas de *Bt*, determinando su efecto sobre ciertas especies de Melolonthidae. Al no existir antecedentes, sólo queda puntualizar los aspectos más relevantes que se observaron en los tres bioensayos realizados, en este rubro de evaluación. Se pueden destacar dos puntos:

a) Las cepas IB477 e IB209 fueron las que mejores resultados ofrecieron al respecto, en los primeros dos bioensayos y en el bioensayo III, respectivamente. Con ellas se cumplió la sintomatología propuesta para esta bacteria.

b) A partir de la actividad de estas dos cepas y de las demás utilizadas en el estudio (que a pesar de no presentar resultados importantes, si expresaron algunas evidencias de toxicidad), puede asegurarse que en general, el factor clave que determinó la morbi-mortalidad fue la actividad tóxica de *Bt*.

Al buscar elementos de comparación con trabajos anteriores y el presente, el medio utilizado para la inoculación de la bacteria presenta algunos aspectos que los relaciona de alguna manera. El uso de zanahoria como medio de inoculación se ha reportado en algunos trabajos (Villalobos et al., 1993; Calderón, 1998), y se ha destacado por su eficacia en el monitoreo de la inhibición de la alimentación que se presenta en las larvas, después de su infección. A partir de estos antecedentes y a lo observado en el presente estudio, se sugiere ampliamente el uso de zanahoria o papa (Hidalgo et al., 1998) como simuladores efectivos de la alimentación de la gallina ciega. Así mismo, en el presente estudio se reporta por primera vez el uso de fragmentos cilíndricos de agar con dimensiones constantes, para la inoculación de mezclas espora:cristal de *Bt*. Este método ofrece excelentes perspectivas para realizar evaluaciones de DL₅₀ o CL₅₀ en gallinas ciegas.

Anteriormente ya se había utilizado el agar, pero no como un medio de inoculación, sino más bien como parte de una dieta artificial de larvas de *Costelytra zealandica*, para su cría en condiciones controladas de laboratorio (Wigley & Dhana, 1992).

Respecto a la anorexia, no se cuenta con información precisa para *Bt* al respecto. Únicamente se tienen reportes de este tipo en pruebas con *Serratia entomophila*, y por ello resulta difícil establecer puntos de referencia para los resultados obtenidos en nuestro estudio. De esta manera, sólo puede establecerse un antecedente y así profundizar en el análisis de este parámetro en evaluaciones futuras.

En nuestro bioensayo I se obtuvieron los primeros esbozos de anorexia en el primer intervalo de observación (1 a 7 días), que podría considerarse como fase temprana del tratamiento. Esto fue resultado de la actividad de la cepa IB477 en larvas de *Ph. ravidia* y *A. inconstans*, y algo similar ocurrió con la cepa IB205. De estos resultados se infiere que la actividad anoréxica de las larvas se expresó de manera temprana, ubicándose entre los 5 y los 10 días en todas las cepas. Según Calderón (1998), *S. entomophila* provoca un efecto anoréxico en larvas de *Ph. trichodes* y, *Ph. misteca*, el cual puede dividirse en dos fases: una fase temprana que abarca los primeros 10 días del bioensayo, y otra fase tardía que se observa después de los 16 días. En lo que respecta a los bioensayos II y III, sólo después de los 15 días de tratamiento se comenzaron a observar los primeros resultados significativos de anorexia, principalmente con el uso de las cepas IB477, KB92 e IB209 respectivamente.

A juzgar por la anorexia, se abre la posibilidad de que la actividad de *Bt* se presente de manera gradual, progresiva, y que impida que la larva siga alimentándose durante algún tiempo, e incluso, sin llegar al fallecimiento. En este sentido en el bioensayo III se utilizaron cristales de *Bt* en estado prácticamente puro (cepas KB, IB293 e IB209 en su modalidad 1:7) y una mezcla espora:cristal 1:1 también para la cepa IB209, con el objeto de determinar el papel que desempeña el cristal insecticida en una prueba de toxicidad, y en especial, en la anorexia. Al comparar los resultados entre ambas mezclas espora:cristal de la cepa IB209, no se encontraron diferencias estadísticas (análisis no presentados). A pesar de ello, fue evidente que la proporción 1:7 dio mejores resultados en la mayoría de los parámetros evaluados. De aquí se desprenden dos consideraciones: 1) ambas mezclas pueden garantizar una actividad tóxica importante en contra de la gallina ciega; 2) la presencia de la espora en una aplicación de *Bt* no es un factor determinante para la obtención de buenos resultados: el uso del cristal de *Bt* (en dosis adecuadas) puede ser suficiente.

Esto sugiere que la espora no tiene un papel activo en la toxicidad (Núñez-Valdez, com. pers.), lo cual difiere de lo encontrado en anteriores estudios al respecto. Miyasono et al., 1994 (en Ellar, 1997), le confiere a la espora (en determinadas subespecies de *Bt*) un papel importante en el incremento del efecto del cristal insecticida. Según este mismo autor, para algunas subespecies de *Bt* (como Kurstaki HD1) el efecto sobre la CL_{50} puede ser incrementado alrededor de 150 veces con la presencia de esporas (en Ellar, 1997). Aunque a decir verdad, dicho incremento sobre el efecto del cristal puede ser debido a procesos de germinación y a las células vegetativas de *Bt*, y no necesariamente a la presencia física de la espora (Van-Nguyen, 1995 en Ellar, 1997).

Por otro lado, Johnson & McGaughey (1997), aseguran que el efecto de los cristales insecticidas y las esporas es sinérgico (en Lorence, 1997), lo cual también contrasta con lo observado en el presente estudio.

Con base en lo anterior, es un hecho que será necesario corroborar nuestros resultados y profundizar en el potencial del cristal de *Bt*. Si logra consolidarse esta idea, en un futuro podrían utilizarse los cristales de *Bt* aislados, de acuerdo a una dosis determinada, para el manejo de la gallina ciega. Algunas especies al no encontrar su fuente de alimentación en el suelo, se dirigen a las raíces de las plantas que representan el aporte de materia orgánica que necesitan (Villalobos, com. pers.). Si lograra provocarse la anorexia de estas larvas con el uso de un determinado número de cristales de *Bt* o de una dosis en particular, podría evitarse su muerte y el ataque de las raíces disminuirá de manera importante. Además, las larvas continuarán su papel ecológico en el suelo, sin alterar el equilibrio del agroecosistema (sección II.4). Sin embargo, es necesario fundamentar perfectamente esta idea, ya que aún se presentan enormes vacíos de información y resulta determinante conocer qué sucede después de que la larva deja de alimentarse. Si realmente las larvas no mueren al ingerir el cristal bacteriano, habrá que garantizar que no volverán a atacar las raíces del cultivo. Aún no se conocen varios de los mecanismos moleculares que provocan la inhibición de la alimentación en estos insectos, ni tampoco el tiempo que durará este efecto anoréxico ni sus secuelas.

De ahora en adelante, la anorexia podría ser considerada como un indicador sensible de la toxicidad de *Bt*, y convertirse en un elemento clave en el manejo de las larvas de Melolonthidae. Pero es un hecho que aún se requiere de mayor investigación al respecto.

3. Análisis CL_{50}

A diferencia del índice de morbi-mortalidad y la anorexia, la CL_{50} es un parámetro que cuenta con antecedentes en trabajos de este tipo, aunque son muy escasos. La mayoría de las pruebas de actividad tóxica con *Bt* se basan en la obtención de la Dosis Letal 50 (DL_{50}), por lo que la comparación con nuestros resultados no es viable. La prueba DL_{50} se utiliza en ensayos en los que existe certidumbre en la cantidad exacta de insecticida que se aplica al insecto, mientras que la CL_{50} se utiliza únicamente cuando el insecto se expone a un ambiente contaminado con el tóxico, sin conocer exactamente la cantidad administrada (Busvine, 1971 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994). En un bioensayo para determinar la CL_{50} deben de realizarse de 7 a 9 diluciones de la muestra original y del estándar de referencia en buffer de fosfatos pH=7 (Gallegos, 1990). Este fue el caso del bioensayo III, aunque nuestras diluciones y el medio de cultivo utilizado variaron un poco.

En el caso de la cepa KB92 utilizada en este estudio, funcionó como elemento de referencia para evaluar la toxicidad de las otras cepas candidatas (IB209 e IB293), y además, abrió perspectivas para considerarla como alternativa de control para especies de gallina ciega mexicanas, a pesar de ser una cepa aislada de melolonthidos del Japón. Su efectividad ha sido comprobada en diversos estudios en ese país, y una de las pruebas utilizadas para la evaluación de su toxicidad es el cálculo de la CL_{50} (Susuki et al., 1992; 1993 en Alm et al., 1997; Hori et al., 1994). Sin embargo, no es posible utilizar estos trabajos como referencia, ya que en ellos se utilizan especies de coleópteros diferentes a las utilizadas en este trabajo.

En México, no existen antecedentes de pruebas de CL_{50} para gallinas ciegas. De ahí que este estudio represente una base importante para este tipo de análisis, y sugiera la posibilidad de encontrar toxicidad no sólo en cepas introducidas, sino en cepas nativas en contra de especies de Melolonthidae mexicanas.

VII.2. Cría y mantenimiento de larvas de Melolonthidae, en condiciones de laboratorio

Originalmente, en nuestro estudio no estaba contemplado el profundizar en aspectos relacionados con la cría y mantenimiento de gallinas ciegas en condiciones controladas. Sin embargo, la necesidad de obtener los ejemplares suficientes para llevar a cabo los bioensayos, provocó que se buscaran alternativas para garantizar una sobrevivencia importante. Fue así como surgió el método de cría utilizado en este trabajo, el cual además de haber dado resultados aceptables, se distinguió por ser sumamente práctico. En este sentido, existen pocos reportes previos que aborden la cría de estos insectos en condiciones de laboratorio y la mayor parte de ellos requieren de la utilización de una cantidad importante de material. Entre estos destacan los de Reinhard, Islas y los de Wigley & Dhana. Reinhard (1942), implementó un método para criar gallinas ciegas del género *Phyllophaga* en el laboratorio, consistente en colocar los huevos obtenidos de manera individual en latas pequeñas que contenían 114 gr. de arena húmeda esterilizada y después las larvas que emergían se colocaban en latas con 170 gr. de suelo orgánico húmedo, guardándolas en un cuarto donde la temperatura y humedad se mantenían constantes. (en Campos-Bolaños, 1983).

Por su parte, Islas estudió la biología de *Phyllophaga rubella* utilizando para la cría de larvas las cuevas ideadas por McCollock en 1917, obteniendo buenos resultados con la construida a 50 cm. bajo el nivel del suelo que tiene 2.5 m. de altura, 1.5 m. de ancho y 3 m. de longitud, revestida internamente con ladrillo, lo que mantiene temperaturas de 1 y 2 °C a una humedad relativa del 90% (en Islas, 1964).

En el caso de Wigley & Dhana (1992), propusieron un método de cría para larvas de *Costelytra zealandica*, basado en exponer a las larvas y pupas a temperaturas bajas, acelerando su emergencia al estado adulto y promoviendo a su vez su fecundidad y longevidad. Demostraron también que la cría de este insecto podía realizarse desde el huevo hasta su etapa adulta con una dieta semisintética convencional, compuesta principalmente por recursos nutricionales primarios como granos, proteínas animales, azúcares y otros, además de algunos suplementos como aceites, vitaminas y sales minerales.

En contraparte, en nuestro estudio se buscó la optimización de los recursos: sólo se utilizaron envases de plástico con suelo fresco, en los cuales se colocaron las parejas de adultos para la obtención de los huevos. Al emerger las larvas, se colocaron individualmente en pequeños frascos de plástico, alimentándolas únicamente con una pieza de zanahoria fresca. Se observó una elevada sobrevivencia en todas las especies de gallina ciega involucradas en el presente estudio. Según King (1994), las larvas de primer estadio son altamente vulnerables a condiciones adversas; en estudios de laboratorio, este mismo autor ha reportado que más del 75% de las larvas mueren durante el primer estadio. En nuestra cría, se manejó un porcentaje de recuperación de larvas, con el cual se evidenció una sobrevivencia elevada en todas las especies de Melolonthidae involucradas, alcanzándose porcentajes de recuperación superiores al 75% (Cuadro 3), muy por encima del 25% estimado por King en 1994. Estas diferencias en la sobrevivencia reportadas en uno y otro trabajo son difíciles de explicar. Si bien en un principio lo observado en nuestro trabajo daba indicios de que se había llevado a cabo una adecuada manipulación y mantenimiento de las larvas en condiciones de laboratorio presumiblemente óptimas, surge por otro lado la posibilidad de que las especies involucradas en esta cría puedan ser menos susceptibles que otras en las mismas condiciones de laboratorio (King no hace referencia en su reporte de las especies de larvas utilizadas). Pudiera tratarse de una combinación de ambos factores, pero al margen de encontrar la explicación satisfactoria cabe hacer mención de los buenos resultados obtenidos en la cría propuesta en el presente estudio.

Por otro lado, el caso de *Anomala inconstans* es interesante. Después de *Phyllophaga ravidia*, fue la especie de gallina ciega que más ejemplares registró como resultado de los apareamientos de adultos. Pero lo extraordinario radica en que de *A. inconstans* sólo se colectaron 27 adultos y de su apareamiento surgieron 114 larvas, lo que evidencia la enorme capacidad reproductiva de esta especie. El promedio de huevos que puede poner una hembra es de 25, y la mayor parte de ellas sólo tiene una puesta en su vida (Morón, com. pers.). El número promedio en algunas especies es de 7 huevos en *Phyllophaga rubella* (Islas, 1964), 14 en *Ph. sturmi*, 23 para *Ph. obsoleta* y 28 para *Ph. blanchardi* (Morón, 1986). La hembra de *Ph. menetriesi* puede poner hasta 140 huevos durante periodos de 100 días (King, 1994). En nuestra cría no se contabilizó el número de huevos obtenidos por hembra; sin embargo, los porcentajes de recuperación de larvas sugieren una alta oviposición por parte de las hembras de esta especie.

Para futuros estudios de este tipo, sería recomendable cuantificar también el número de huevos obtenidos por hembra y así conocer la vulnerabilidad de las diferentes especies en esta etapa de su desarrollo (existen escasos estudios al respecto). El conocimiento de los hábitos reproductivos de los melolontidos, podría aportar elementos que motiven a profundizar en aspectos clave de su biología y ecología, en especial del género *Anomala*, tan escasamente estudiado.

Por lo poco que se sabe de sus integrantes y por considerarlos arbitrariamente en la mayoría de los casos como plagas, posiblemente se están pasando por alto los beneficios que brindan al suelo (Núñez-Valdéz, 1993; Villalobos, 1994b). La cría de larvas de escarabajos, y en especial de melolontidos cuenta con poco respaldo de estudios previos al respecto, por lo que es difícil establecer un punto de referencia a partir del cual se determine la eficacia de un método en particular. Sin embargo, como el objetivo de nuestra cría era únicamente el de contar con un número de larvas suficiente para realizar los primeros bioensayos, el método utilizado cumplió con las expectativas.

VII.3. Perspectivas del uso de *Bt* en el manejo sustentable de la gallina ciega

Entre los microorganismos patógenos de insectos, *Bt* es la bacteria que ha ofrecido los resultados más alentadores, con un gran éxito en el mercado, por lo que se ha profundizado en su estudio. De los 124 genes *cry* reportados en la actualidad (Crickmore et al., 1998), las cepas portadoras de los genes *cry8C* han mostrado toxicidad en contra de los insectos Melolonthidae (Ogiwara et al., 1995 en Barreda, 2000). Si bien son escasos los reportes sobre toxinas de *Bt* específicas contra integrantes de la familia Melolonthidae, existen diversos trabajos referentes a la búsqueda de nuevas variedades con estas características de toxicidad (Cuadros 5 y 6).

Sharpe (1976) detectó toxicidad en algunos cristales proteicos de la variedad *galleriae* de *Bt*, al probarlos en contra de larvas del Rutelinae *Popillia japonica*. En 1988, Liu y colaboradores reportaron excelentes resultados en el control de larvas Melolonthidae en campos de cacahuete de China, mediante el uso de *Bt* variedad *Kurstaki* (en Barreda, 2000). En los últimos años, se ha acelerado el descubrimiento de nuevas cepas activas de *Bt*, como las reportadas en contra de larvas del escarabajo melolontido *Costelytra zealandica* (Wigley & Chilcott, 1990 en Barreda, 2000). En Francia, mediante la aplicación de bioensayos en campo, se han utilizado diferentes cepas de *Bt* con actividad tóxica en contra del Cetoninae *Oxythyrea funesta* Poda con resultados alentadores (Robert et al., 1996 en Barreda, 2000). En Japón, se han realizado pruebas de bioensayos en campo con la cepa *Buibui* (portadora de genes *cry8C*) contra larvas de varios escarabajos rutelinos, como *Anomala cuprea*, *A. rufocuprea* y *Popillia japonica* (Hori et al., 1994), así como también se han desarrollado experimentos de microcosmos en cultivos como la papa, en contra de larvas de *A. cuprea*, obteniéndose resultados alentadores (Susuki et al., 1994). En Estados Unidos, diversas pruebas en campo con la cepa *Buibui* en contra *P. japonica* y *Exomala orientalis* han arrojado también muy buenos resultados (Alm et al., 1997). Por otro lado, se han realizado bioensayos, utilizando a la cepa *Buibui* en combinación con nemátodos (*Heterorhabditis bacteriophora* y *Steinernerma glaseri*), contra dos especies de los Dynastinae *Cyclocephala hirta* y *C. pasadenae*, además de *Anomala orientalis* en laboratorio en Chiuju, República de Corea. Dichos bioensayos se han realizado en áreas de invernadero, en Davis, California y en el campo en San Diego, California (Koppenhöfer et al., 1999). En este último caso, se observó sinergismo de los diferentes entomopatógenos contra las diferentes especies de escarabajos.

En México, el trabajo de Barreda (2000) y el presente estudio, son de los primeros en probar cepas de *Bt* en contra de especies de Melolonthidae presentes en el territorio nacional y evaluar su actividad tóxica. A pesar de la amplia cobertura que recibe el estudio de esta bacteria principalmente en Japón y Estados Unidos, en nuestro país necesita sortear todavía múltiples dificultades, tanto experimentales como socioeconómicas. Una de estas dificultades es el hecho de que *Bt*, aunque es reconocido como un organismo entomopatógeno, es incapaz de producir epizootias (Luna-Olivera y Peña-Cabriales, 1996).

Esto se traduce principalmente en una baja efectividad como regulador de las poblaciones de insectos. Este comportamiento ha sido explicado basándose en la ineficiencia del organismo como agente infectivo (Luty & Ebershold, 1981 en Luna-Olvera y Peña-Cabriales, 1996). En el caso de las gallinas ciegas, es sumamente escasa la información que se tiene sobre ellas, por lo que resulta muy difícil implementar alguna estrategia para su manejo.

Sin embargo, y tomando las debidas reservas que ya se han mencionado anteriormente, en un futuro podría pensarse en un escenario como el siguiente: se detecta un cultivo agrícola con ataque evidente de gallina ciega, y con base en los estudios más profundos que seguramente se habrán realizado con *Bt*, se toma la decisión de utilizar esta bacteria para su manejo. El objetivo es emplear únicamente los cristales aislados de *Bt*, en la dosis adecuada para provocar la anorexia en las gallinas ciegas involucradas en el problema, sin provocarle síntomas alternos de enfermedad. Al ingerir el insecto los cristales, se puede esperar que deje de alimentarse sin llegar a provocarse su muerte, y a su vez disminuya el daño al cultivo. Así, es probable que las larvas continúen en el suelo llevando a cabo sus distintas actividades que promueven potencialmente la fertilidad del mismo como aereación, drenaje y redistribución de nutrientes y microorganismos (Núñez-Valdéz, 1993), manteniendo así el equilibrio del sistema.

Así mismo, se abren otras opciones en el uso de los cristales de *Bt*:

a) Encapsulamiento de la proteína tóxica, para evitar su rápida degradación. Esto se reflejaría en una mayor persistencia de la actividad tóxica de la bacteria, después de varios días de su aplicación en el campo.

b) Inserción del gen bacteriano en microorganismos inocuos, que sean agentes potenciales de un control biológico inundativo, como en el caso de *Serratia entomophila* en la agricultura pastoral de Nueva Zelanda.

c) Inserción del gen bacteriano en plantas para su expresión específica en los tejidos de la raíz. Esto se compagina con el ya mencionado uso del cristal para provocar solamente efectos anoréxicos en las larvas involucradas en el daño a una raíz.

Es preciso señalar que las propuestas anteriores aún presentan algunos aspectos que no tienen cabida en un programa de manejo sustentable, como el de los altos insumos que se necesitan para que puedan implementarse en el campo. Sin embargo, es un hecho que pueden adecuarse a un modelo en el que las condiciones del sistema sean lo menos afectadas posible, resolviendo simultáneamente el problema.

Por todo ello, *Bt* se presenta como una alternativa interesante en el manejo sustentable de estos insectos, con la consigna de que son necesarios más estudios para su consolidación en un programa de esta naturaleza. Se están dando los primeros pasos.

VIII. CONCLUSIONES

1. La cepa KB92, portadora del gene *cry8C*, presentó actividad tóxica en contra de las especies mexicanas de gallina ciega utilizadas en el presente estudio. Sin embargo, no todas las cepas nativas de *Bt* utilizadas que portan este gene específico presentaron toxicidad importante en contra de estos insectos, como fue el caso de las cepas IB184, IB324 e IB293. Esto significa que la presencia de los genes *cry8C* en una cepa de *Bt*, no garantiza efectos tóxicos sobre ciertas especies de gallina ciega. A pesar de su probada actividad tóxica en contra de larvas del género *Anomala*, en el presente estudio la cepa KB92 resultó tóxica también para larvas del género *Phyllophaga* (en particular contra larvas de *Ph. trichodes*), lo que representa el primer reporte de toxicidad de cristales de esta cepa en larvas de *Phyllophaga*.
2. La cepa IB477, portadora de genes *cry8C*, presentó una importante actividad tóxica en contra de larvas de *Anomala inconstans*, *Phyllophaga ravidia* y *Ph. trichodes*, por lo que es necesario darle seguimiento a su análisis molecular y corroborar en particular su actividad anoréxica, la cual podría convertirse en el parámetro fundamental de un programa de manejo sustentable de estos insectos.
3. La cepa IB209 puede ser considerada como potencialmente patógena para *Phyllophaga trichodes*, con base en sus valores CL_{50} : 1.6 $\mu\text{g/ml}$ para la mezcla espora:cristal 1:7, y 2.0 $\mu\text{g/ml}$ para la mezcla 1:1. Estos valores fueron los que más se acercaron al 0.09 $\mu\text{g/ml}$ de la cepa KB92, que fungió como cepa control en el experimento.
4. En el caso de la cepa IB205, debe considerarse seriamente su actividad, ya que a pesar de no provocar efectos letales para las gallinas ciegas, puede ser promisoría una estrategia de manejo sustentable, como el inhibir la alimentación de la larva sin necesidad de provocar su muerte.
5. Las cepas IB184, IB324 e IB293 se caracterizaron por presentar en los diferentes parámetros de evaluación, resultados que no fueron significativos estadísticamente respecto al lote control. Por lo tanto, la posibilidad de considerarlas en un futuro para el manejo de estos insectos, está condicionada a la evaluación de su actividad en otras especies de Melolonthidae.
6. La mezcla espora:cristal 1:7 de la cepa IB209 resultó ser más tóxica en varios de los parámetros evaluados en el bioensayo III. A pesar de las diferencias estadísticas entre sus resultados y los de la mezcla 1:1 no fueron significativos, estos sugieren fuertemente que el cristal insecticida es un factor clave en el mecanismo de toxicidad de las cepas probadas en este bioensayo. Aparentemente la presencia de la espora no es indispensable en un evento de estas características.

7. El método propuesto en este trabajo para la cría de larvas de Melolonthidae resultó adecuado para la obtención de larvas de primer y segundo estadios, y sobre todo por ser muy práctico. Sin embargo tiene las limitantes de estar restringido a una época del período anual reproductivo del escarabajo y a proporcionar un número limitado de ejemplares para estudios de CL₅₀.

8. Los distintos estadios larvales de Melolonthidae utilizados en el estudio, presentaron diferencias en la susceptibilidad a la actividad tóxica de *Bt*. En general, las larvas de tercer estadio lograron sobrevivir más tiempo al ataque de *Bt*, a diferencia de las larvas de primeros y segundos estadios. Sin embargo, al igual que los estadios tempranos, los terceros estadios presentan una importante inhibición en su alimentación al ingerir los cristales tóxicos. Esto podría brindar diferentes alternativas para el manejo sustentable de estos insectos, de acuerdo a la etapa larval en que se encuentren.

IX. REFERENCIAS

- Alm, S. R., M. G. Villani, T. Yeh & R. Shutter. 1997. *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain *Buibui* for control of Japanese and Oriental beetle larvae (Coleoptera:Scarabacidae). *Appl. Entomol. Zool.* 32 (3): 477-484
- Barreda, M. A. 2000. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* potencialmente tóxicas para larvas de escarabajos Melolonthidae (gallina ciega). Tesis para obtener el grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad Veracruzana/IBt-UNAM. 59 p.
- Bravo, A. 1997. Phylogenetic relationships of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin family proteins and their functional domains. *J. Bacteriol.* 179: 2793-2801
- Bravo A., A. Lorence y R. Quintero. 1995. Biopesticidas compatibles con el medio ambiente: *Bacillus thuringiensis*, un modelo único. *Biocontrol* 1(1): 41-53
- Bravo A., M. Ortíz, A. Ortíz, J. Cerón, E. Aranda, J. Sánchez, R. Meza, L. Guereca, M.E. Núñez-Valdéz, y A. Lorence. 1996. Búsqueda y construcción insecticidas de nuevas proteínas de *Bacillus thuringiensis*. *Fronteras en Biotecnología y Bioingeniería. Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.* pp. 375-379
- Bravo, A., S. Sarabla, L. López, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortíz, M. Ortíz, L. Lina, F.J. Villalobos, G. Peña, M.E. Núñez-Valdéz, M. Soberón & R. Quintero. 1998. Characterization of *cry* genes in a mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl. Environ. Microbiol.* 64 (12): 4965-4972
- Bourque, S. N., J. R. Valero, J. Mercier, M. C. Lavole & R. C. Levesque. 1993. Multiplex polymerase chain reaction for detection and differentiation of the microbial insecticida *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 523-527
- Calderón, M. A. 1998. Búsqueda, aislamiento e identificación de *Serratia sp.* (Enterobacteriaceae) entomopatógeno de larvas de Melolonthidae (Coleóptera) en la Reserva de la Biósfera "El Cielo", Tamaulipas. Tesis para obtener el grado de Licenciatura en Biología. UNAM. 65 p.
- Camacho, C.O. 1990. Programa PC PROBIT Ver. 1.0 Centro de Estadística y Cálculo. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México.
- Campos-Bolaños, R. 1983. Las gallinas ciegas como plagas del suelo. En: II Mesa Redonda sobre plagas del suelo. Colegio de Postgraduados y Depto. de Parasitología. UACH; Chapingo, México. pp. C15-C40
- Carozzi, N.B., V.C. Kramer, G.W. Warren, S. Evola & M.G. Kosiol. 1991. Prediction of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains by polymerase chain reaction product profiles. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 3057-3061

- Castro-Ramírez, A.E., Ramírez, C. y L. Ruiz. 1998.** Evaluación del daño causado por gallina ciega. En: M.A. Morón y A. Aragón (eds.). Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. Publicación especial de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología A.C., Puebla, México. pp. 107-120
- Cate, J.R. 1990.** Biological control of pests and diseases: integrating a diverse heritage. En: New directions in biological control. Alternatives for suppressing agricultural pests and diseases. Alan R. Liss, Inc. pp. 23-43
- Cerón, J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina & A. Bravo. 1994.** PCR analysis of the cryI insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60: 353-356
- Chak, K.F., M.Y. Tseng & T. Yamamoto. 1994.** Expresión of the cristal protein gene under the control of the alfa-amilasa promoter in *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol. 60: 2304-2310
- Coulson R.N. y J.A. Witter. 1990.** Entomología Forestal. Ecología y control. Editorial Limusa S.A. de C.V. Grupo Noriega Editores. México, D.F. 751 p.
- Cremlyn, R. 1990.** Plaguicidas modernos y su acción bioquímica. Ed. Limusa S.A. de C.V. 356 p.
- Crickmore N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. VanRie, D. Lereclus, J. Baum & D.H. Dean 1998.** Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 807-813
- Davidson, R.H. 1992.** Plagas de insectos agrícolas y del jardín. Ed. Limusa S.A. de C.V. 743 p.
- Douglas, R.D. & R.J. Donald. 1989.** Programa SEQAID II versión 3.5. Molecular Genetics Laboratory. Kansas, State University
- Ellar, D.J. 1997.** The estructure and function of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins and prospects for biopesticide improvement. BCPC Symposium Proceedings. Mycrobial insecticides: Novelty or Necessity? 68: 83-100
- Gallegos, G. 1990.** Implementación de la concentración mínima letal como método para cuantificar actividad de formulación de *Bacillus thuringiensis*. BIOTAM 2 (1): 15-23
- Gaugler, R., Y. Wang & J.F. Campbell. 1994.** Aggressive and evasive behaviors in *Popillia japonica* (Coleoptera:Scarabidae) larvae: defenses against entomopathogenic nematode attack. J. Invertebr. Pathol. 64: 193-199

- Glare, T.R. 1992. Fungal pathogens of scarabs. In: Use of pathogens in scarab pest management (T. R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 63-77
- Glare, T.R. & A.M. Crawford. 1992. Viral diseases of scarabs. In: Use of pathogens in scarab pest management (T. R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 21-32
- Hanson, P. 1994. Control biológico de *Phyllophaga*: depredadores y parasitoides. En: Biología y control de *Phyllophaga spp.* (Shannon, P.J. y M. Carballo, editores). Memorias del Seminario-Taller Centroamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga spp.*, CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 74-79
- Hanula, J.L. & T.G. Andreadis. 1992. Protozoan pathogens of the Scarabaeidae. In: Use of pathogens in scarab pest management (T. R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 79-91
- Hidalgo, E., P.J. Shannon y L. Flores. 1998. Selección de cepas de *Bacillus popilliae* para el control de especies de *Phyllophaga* (Coleoptera:Melolonthidae). En: Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos (M. A. Morón y A. Aragón, eds.). Publicación especial de la BUAP y la Soc. Mex. Entomol. A.C. Puebla, México. pp. 165-172
- Hofte H. & H.R. Whiteley. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev.53: 242-255
- Hori, H., N. Suzuki, K. Ogiwara, M. Himejima, L.S. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba & H. Iwahana. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain Buibui specific for scarabeid beetles. J. Appl Bacteriol. 76: 307-313
- Islas, S. F. 1964. Biología y combate de la gallina ciega *Phyllophaga rubella* (Bates), en San Cayetano, Mex. Boletín técnico del Instituto de Investigaciones Forestales, México. 13, 1-23
- Jackson, T.A., A.M. Hugher & T.R. Glare. 1993. Pathology of amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. J. Invertebr. Pathol. 61: 123-130
- Kalman, S., K.L. Kiehne, J.L. Libs & T. Yamamoto. 1993. Cloning of a novel *cryIc*-type gene from a strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. Appl. Environ. Microbiol. 59: 1131-1137
- King, A.B.S. 1994. Biología, identificación y distribución de especies económicas de *Phyllophaga* en América Central. En: Biología y control de *Phyllophaga spp.* (Shannon, P.J. y M. Carballo, editores). Memorias del Seminario-Taller Centroamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga spp.*, CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 50-61
- Klein, M.G. 1992. Use of *Bacillus popilliae* in Japanese beetle control. In: Use of pathogens in scarab pest management (T. R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 179-189

- Klein M.G. & T.A. Jackson, 1992.** Bacterial diseases of Scarabs. In: Use of pathogens in scarab pest management (T. R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 43-61
- Koppenhöfer, A.M., H.Y. Choo, H.K. Kaya, D.W. Lee & W.D. Gelernter. 1999.** Increased field and greenhouse efficacy against scarab grubs with a combination of an entomopathogenic nematode and *Bacillus thuringiensis*. *Biological Control*. Vol.14(1): 37-44
- Krieg, A. 1971.** Possible use of rickettsiae for microbial control of insects. In: *Microbial Control of insects and mites*. H.D. Burgess Academic Press (Inc.) London. pp. 173-179
- Lagunes-Tejeda, A. y M. Vázquez-Navarro. 1994.** El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. pp. 3-31
- Lorence, A. 1995.** Diseño de un sistema de detección de nuevas delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. Tesis de Maestría en Biotecnología, IBT-UNAM. 113 p.
- Lorence, A. 1997.** Análisis de la actividad de formación de poro de las proteínas cry de *Bacillus thuringiensis* en presencia de su receptor nativo. Tesis Doctoral en Biotecnología. IBT-UNAM. 93 p.
- Luna-Olvera; H.A. y Peña-Cabriales, J.J. 1996.** Ecología de *Bacillus thuringiensis*. En: *Avances recientes en la Biotecnología en Bacillus thuringiensis* (Galán-Wong, Rodríguez-Padilla y Luna-Olvera, eds.). UANL, Monterrey, México. pp. 179-185
- Maniatis, T., E. F. Fritsch & J. Sambrook. 1989.** *Molecular cloning: a Laboratory Manual*. 2ª Edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Capítulo 6
- Martínez, M. 1979.** Catálogo de nombres vulgares y científicos de plantas mexicanas. Fondo de Cultura Económica, México. 1220 p.
- Meyer, J.L. & G.S. Helfman. 1993.** The ecological basis of sustainability. *Ecological Applications*. 3 (4):569-571
- Morón, M. A. 1983.** Introducción a la Biosistemática y Ecología de los coleópteros Melolonthidae edafícolas en México. En: *II Mesa Redonda sobre plagas del suelo*. Colegio de Postgraduados y Depto. de Parasitología. UACH; Chapingo, México. pp. C1-C13
- Morón M. A. 1984.** Escarabajos: 200 millones de años de evolución. Publ. 14. Instituto de Ecología, México. 130 p.
- Morón, M. A. 1986.** El género *Phyllophaga* en México (Insecta Coleóptera). Morfología, distribución y Sistemática supraspecífica. Publ. 20 Instituto de Ecología, México. 342 p.

Morón, M. A. y C. Deloya. 1991. Los Coleópteros Lamelicornios de la Reserva de la Biosfera "La Michilia", Durango, México. *Folia Entomol. Mex.* 81: 209-283

Morón, M. A. 1996. Los Coleoptera Melolonthidae edafícolas en América Latina. Publicación especial DICA-IC, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y Sociedad Mexicana de Entomología, Puebla, México. 180 p.

Morón, M. A., B.C. Ratcliffe y C. Deloya, 1997. Atlas de los escarabajos de México. Coleoptera:Lamelicornia. Vol. I. Familia Melolonthidae. Rutelinae, Dynastinae, Cetoniinae, Trichiinae, Valginae y Melolonthinae. CONABIO y Soc. Mex. Entomol., Xalapa, Veracruz, México. 270 p.

National Academy of Science (NAS). 1982. Manejo y control de plagas de insectos. Control de plagas de plantas y animales. Vol. III. Ed.Limusa S.A. de C.V., México. 574 p.

Núñez Valdéz, M.E. 1993. Perspectivas de la biología molecular en el control de larvas de Scarabaeidae de importancia agrícola. En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas (M.A. Morón compilador). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Ver. México. pp. 217-233

Núñez-Valdéz, M.E. & K. Mahanty. 1996. The amb2 locus from *Serratia entomophila* confers anti-feeding effect on larvae of *Costelytra zealandica* (Coleoptera:Scarabaeidae). *Gene*, 172: 75-79

Núñez-Valdéz, M. E., F.J. Villalobos, M.A. Barreda, A. Romero, L. Hernández & A. Bravo. 2000. Isolation and identificación of a putative *Bacillus sphaericus* strain producing Cry-like proteins. Poster de la 33ª Reunión Anual de la Sociedad de Patología de Invertebrados. Universidad de Guanajuato, México.

Ohba, M., H. Iwahana, S. Asano, N. Suzuki, R. Sato & H. Hori. 1992. A unique isolate of *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis with a high larvicidal activity specific for scarabeid beetles. *Lett. Appl. Microbiol.* 14: 54-57.

Pimentel, D., T.W. Culliney, I.W. Buttler, D.J. Rejnemann & K.B. Beckman. 1989. Low input sustainable agriculture using ecological management practices. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 27:3-24

Reganold, J.P., R.L. Papendick & J.F. Parr. 1990. Sustainable Agriculture. *Scient. Am.* Vol.262(6) pp. 112-120

Ríos, R.F. y S. Romero. 1982. Importancia de los daños al maíz por insectos del suelo. *Folia Entomológica Mexicana*. 52:41-60

Robert, P., J. Chaufaux & M. Marchal. 1994. Sensivity of larval *Oxythyrea funesta* (Coleoptera:Scarabaeidae, Cetoniinae) to three strains of *Bacillus thuringiensis* (subsp. Tenebrionis). *J. Invertebr. Pathol.* 63: 99-100

Robert, P., J. Chaufaux & M. Marchal. 1996. Sensitivity of larval *Oxythyrea funesta* Poda (Coleoptera: Scarabaeidae, Cetoniinae) to different strains of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 67:187-189

- Romero-Nápoles, G. 1983. Control biológico de plagas en el suelo. En: II Mesa Redonda sobre plagas del suelo. Colegio de Postgraduados y Depto. de Parasitología. UACH; Chapingo, México. pp. G1-G35
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Fietelson, D.R. Zeigler & D. H. Dean. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62 (3):775-806
- Shannon, P.J. 1994. Control microbiano de *Phyllophaga spp.* (Coleoptera:Melolonthidae). En: *Biología y control de Phyllophaga spp.* (Shannon, P.J. y M. Carballo, editores). Memorias del Seminario-Taller Centroamericano sobre la biología y control de *Phyllophaga spp.*, CATIE, Turrialba, Costa Rica. pp. 80-93
- Shannon, P.J., S.M. Smith y E. Hidalgo. 1993. Evaluación en el laboratorio de aislamientos costarricenses y exóticos de *Metarhizium spp.* y *Beauveria spp.* contra larvas de *Phyllophaga spp.* (Coleoptera:Scarabaeidae). En: *Diversidad y manejo de plagas subterráneas* (M.A. Morón compilador). Publicación especial de la Sociedad Mexicana de Entomología e Instituto de Ecología, Xalapa, Ver. México. pp. 203-215
- Sharpe, E.S. 1976. Toxicity of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* to Japanese beetle larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 27:421-422
- Susuki, N., H. Hori, M. Tachibana & S. Asano. 1994. *Bacillus thuringiensis* strain Buibui for control of cupreus chafer, *Anomala cuprea* (Coleoptera:Scarabaeidae) in turfgrass and sweet potato. *Biological Control*. 4: 361-365
- Theunis, W. & I. Aloali'i. 1999. Susceptibility of the Taro Beetle, *Papuana uninodis* (Coleoptera:Scarabaeidae) to two new *Bacillus popilliae* isolates from *Papuana spp.* *Invertebr. Pathol.* 73: 255-259
- Van Rie, J. 1992. The role of membrana binding of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins in specificity and resistance. PhD Thesis. Universiteit Gent, Bélgica. pp. 1-29
- Villalobos, F. J. 1992. The potential of entomopathogens for the control of white grub pests of corn in México. In: *Use of pathogens in scarab pest management* (T.R. Glare & T.A. Jackson, eds.) Intercept. UK. pp. 253-258
- Villalobos, F. J. 1994a. The role of soil organic matter in the sustainable management of the grass grub *Costelytra zealandica* (White) in the Caterbury pastures. PhD Thesis. Lincoln University, New Zealand. 242 p.
- Villalobos, F. J. 1994b. The contribution of melolonthid larvae to soil fertility. 15° Congreso Mundial de la Ciencia del Suelo. 4: 129-143
- Villalobos, F. J. 1995. El manejo sostenible de plagas del suelo: el caso de las larvas de Melolonthidae. En: *Métodos alternativos al químico para el control de plagas*. Aragón, G.A. (ed.). Publicación especial Soc. Mex. Entomol. Puebla, México. pp. 69-89

Villalobos, F. J. 1998. Bioecology and sustainable management of white grubs (Coleoptera:Melolonthidae) pest of corn in "El Cielo" Biosphere Reserve, Tamaulipas, México. En: Avances en el estudio de la diversidad, importancia y manejo de los coleópteros edafícolas americanos. M. A. Morón y A. Aragón (eds.). Publicación especial de la BUAP y la Soc. Mex. Entomol. A.C. Puebla, México. pp. 173-184

Villalobos, F. J. 1999. The Sustainable Management of white grubs (Coleóptera: Melolonthidae) pest of corn in "El Cielo" Biosphere Reserve, Tamaulipas, México. Journal of Sustainable Agriculture, Vol. 14 (1). The Haworth Press, Inc. pp. 5-29

Villalobos, F.J., K.M. Goh, R.M. Emberson, R.B. Chapman y R.B. MacPherson. 1993. Interacciones entre la materia orgánica del suelo, la bacteria *Serratia entomophila* Grimont et al. y la alimentación de larvas de *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera:Melolonthidae). En: Diversidad y manejo de plagas subterráneas (M.A. Morón compilador). Pub. Soc. Mex. Entomol. e Instituto de Ecología A.C., Xalapa, Ver. México. pp. 235-253

Villalobos, F. J., K.M. Goh, D.J. Saviile & R.B. Chapman. 1997. Interactions among soil organic matter, levels of the indigenous entomopathogenic bacterium *Serratia entomophila* in soil, amber disease and the feeding activity of the scarab larva of *Costelytra zealandica*: a microcosm approach. Appl. Soil Ecology. 5: 231-246

Wigley P.J. & S. Dhana. 1992. Development of an artificial diet and laboratory handling methods for the New Zealand grass grub, *Costelytra zealandica*. In: Use of pathogens in scarab pest management (T.R. Glare & T.A. Jackson, T.A., eds.). Intercept: UK. pp. 11-19

Zelazny, B., A. Lolong & B. Pattang. 1992. *Oryctes rhinoceros* (Coleoptera:Scarabaeidae) populations suppressed by a baculovirus. J. Invertebr. Pathol. 59: 61-68.

APÉNDICE

A. Preparación de soluciones y medios de cultivo

1.- Medio LB - Luria-Bertani

Por lt.:

A 950ml. de agua desionizada agregar:

- a) bacto-tryptona 10 gr.
- b) extracto de levadura 5 gr.
- c) cloruro de sodio 10 gr.

2.- TAE-buffer 50X Tris-Acetatos (para electroforesis)

Por lt.:

- a) 242 gr. Tris base
- b) 57.1 ml. ácido acético glacial
- c) 100 ml. 0.5M EDTA (pH 8.0)

3.- 0.5 EDTA

Agregar 16.1 gr. de EDTA ($2H_2O$) a 800 ml. de agua. Se ajusta el pH a 8.0 con NaOH

4.- TE pH 8.0

- a) 10 mM Tris-Cl (pH 8.0)
- b) 1 mM EDTA (pH 8.0)

5.- buffer 6X Tipo III (buffer para corrimiento de gel)

- a) 0.25% de azul de bromofenol
- b) 0.25% de cyanol xileno FF
- c) 30% de glicerol en agua

B. Anexo informativo

B.1. Importancia de los entomopatógenos y entomófagos en el manejo de plagas

La consolidación de un método de control biológico confiable y eficiente mediante el uso de entomopatógenos requiere sortear todavía diversas dificultades. Además de contar con una gran propagación *in vitro*, una alta persistencia en el campo y un amplio e ilimitado nivel de virulencia e infección, un entomopatógeno viable debe ofrecer una total reducción de riesgos para el ambiente y para otras formas de vida (insectos benéficos, plantas, vertebrados). Así mismo, debe presentar resultados a corto plazo, con una acción letal rápida (lo que permitiría que los costos de producción se redujeran ostensiblemente y que su comercialización aumentara en su rentabilidad), así como estados de resistencia o letargo para soportar condiciones adversas, de modo que sea posible almacenar a dicho patógeno durante mucho tiempo (Coulson y Witter, 1990).

Para la agricultura mexicana, se promueven tres alternativas fundamentales para optimizar la utilización de un entomopatógeno (Villalobos, 1992):

- a) Identificar el complejo natural de plagas y sus patógenos, todo sustentado por estudios detallados de su bioecología. Es un proceso a largo plazo, lento, que requiere una investigación exhaustiva, pero ofrece resultados confiables y sin riesgos
- b) Introducir patógenos exóticos sólo cuando las especies nativas han fallado en el control de insectos plaga y esto provoque serias pérdidas económicas. Esta opción ofrece resultados a corto plazo, aunque con evidentes situaciones de riesgo
- c) Considerar el efecto de patógenos nativos en relación a la diversidad vegetal de un agroecosistema determinado

La gran diversidad de insectos del suelo, nocivos a los cultivos, es explicable si se toma en cuenta que aproximadamente del millón de ellos descritos a la fecha; se considera que casi el 95% pasa en el suelo por lo menos en un estado biológico de su crecimiento, ya sea sobre su superficie o dentro del mismo (Romero-Nápoles, 1983). Y no obstante que no todas sus formas biológicas son perjudiciales para los cultivos, existen las etapas larvales que se caracterizan por su actividad destructora.

Entre los microorganismos que presentan actividad patógena contra estas plagas del suelo destacan los virus, las rickettsias, las bacterias, los hongos y los protozoarios, además de los nemátodos; en menor escala. Entre los enemigos naturales existen algunos insectos y otros grupos menos frecuentes tales como aves y anfibios. La gran mayoría de los microorganismos tienen un gran potencial como agentes de control contra varios insectos, incluyendo a los escarabajos (Glare et al., 1992).

En la actualidad, se ha avanzado de manera importante en el reconocimiento de especies de virus, bacterias, hongos, nemátodos, y protozoos con potencial tóxico en contra de insectos plaga, específicamente contra escarabajos, además de ciertos insectos con actividad entomofágica o parasitoide (Cuadro 5).

1. Virus y baculovirus

Aunque muchos virus son utilizados en programas de control de insectos, se presentan varios problemas en su manejo. Son generalmente lentos para matar, presentan una baja persistencia y son altamente específicos. De los virus activos contra escarabajos, en el que se han enfocado los estudios moleculares es el virus iridiscente de *Costelytra zealandica* (CzIV) y el baculovirus *Oryctes* (OrV) (Glare et al., 1992).

Los baculovirus son virus largos con genomas de DNA de doble hélice. La familia Baculoviridae está subdividida taxonómicamente en tres subgrupos: A, B y C. El subgrupo A está conformado por los llamados virus de la poliedrosis nuclear (NPVs), los cuales se encuentran ocluidos dentro de cristales proteicos conocidos como poliedros. Han sido principalmente estudiados por su amplio intervalo de huéspedes y su gran potencial como bioinsecticida y representan más del 40% de los virus de insectos que se han descrito (Coulson y Witter, 1990).

El subgrupo B corresponde a los virus de la granulosis (GVs). A diferencia de los NPVs, los GVs están individualmente organizados con un solo virión dentro del cristal (gránulo). Al subgrupo C corresponden los virus que no están rodeados por un cristal proteico y son denominados baculovirus no-ocluídos (NOBs), es decir, no tienen cuerpo de inclusión (Núñez-Valdéz, 1993). La mayoría de los huéspedes de estos virus son los estados inmaduros, que son altamente susceptibles; los adultos pueden llevar el virus, pero por lo general sobreviven al ataque.

Las larvas de insectos infectadas con NPVs normalmente presentan pocos síntomas distintivos hasta unas pocas horas antes de morir. Cuando estos virus son ingeridos por la larva, los poliedros se disuelven y liberan bastones virales (viriones) en el intestino medio. Pronto pasan a través de la pared del intestino medio y entran a células susceptibles como los adipocitos, células sanguíneas y tejido epidérmico. El tiempo de la ingestión de estos virus y la muerte de las larvas varía de 4 días- 3 semanas (Coulson y Witter, 1990).

En algunas especies de insectos, las larvas infectadas pueden cesar de alimentarse, presentan poca movilidad y adquieren una coloración pálido amarillenta. Se pueden hinchar ligeramente, y se tornan flexibles y flácidas. Poco antes y después de la muerte, el integumento es muy frágil y fácilmente se rompe, dando salida al contenido licuado, compuesto por tejido desintegrado y poliedros. Comparada con la poliedrosis nuclear, los síntomas de la virosis granulósica son más evidentes; varían de acuerdo con la especie huésped. La larva enferma es menos activa que la sana, más flácida y toma un aspecto pálido translúcido. El período desde que se adquiere la infección hasta la muerte varía de 6 a 20 días (De Bach, 1979 en Romero-Nápoles, 1983).

Dentro de los baculovirus infecciosos hacia Scarabaeidae se encuentra, como ya se indicó, *Oryctes*, que pertenece a los virus del grupo C (no ocluidos). Este virus es capaz de infectar varias especies del género de escarabajos del mismo nombre y otros Dynastinae y ha sido utilizado como agente de control biológico en varios países (Alfiler, 1992 en Núñez-Valdéz, 1993) (Cuadro 5).

La identificación de los genes importantes en la patogenicidad viral serían muy útiles para incrementar las potencialidades de uso de este virus como bioinsecticida contra estos insectos (Núñez-Valdéz, 1993).

2. Rickettsias

Representan a un grupo de microorganismos que presentan una estructura celular, cuentan con ácido ribonucleico (RNA) y ácido desoxirribonucleico (DNA) en su estructura, además de estar rodeados por una típica pared celular (Romero-Nápoles, 1983).

La enfermedad causada por estos microorganismos presentan un lento desarrollo, puede dar al cuerpo graso del insecto una coloración verde azulada y matar a su hospedero en un lapso de uno a cuatro meses.

Algunos cuerpos cristalinos se encuentran en asociación con las rickettsias y generalmente causan un efecto dañino a su hospedero. Especies de este tipo se han aislado de coleópteros como es el caso de *Rickettsiella popillae*, *R. melolonthae* y *R. tenebrionis* (De Bach, 1979 en Romero-Nápoles, 1983).

Las infecciones rickettsiales se tienen reportadas en larvas del mayate de mayo *Melolontha spp.* y en larvas del escarabajo japonés *Popilla japonica* (Romero-Nápoles, 1983) (Cuadro 5).

3. Bacterias

Con base en las propiedades o los requerimientos patogénicos, tales como las dosis infectivas, sitio de infección, especificidad del hospedero y modo de acción, Bucher (1960) identificó cuatro grupos de bacterias entomopatógenas: patógenos potenciales, patógenos formadores de esporas y cristales, patógenos facultativos y patógenos obligados.

Los patógenos potenciales son todas las bacterias que pueden multiplicarse en el hemocele de los insectos después de la invasión en dosis relativamente pequeñas, produciendo una septicemia letal.

Los patógenos facultativos son capaces de crecer en el intestino del insecto y producir toxinas o enzimas que dañan los tejidos del hospedero.

Los patógenos obligados son encontrados solamente en asociación con enfermedades específicas.

Los formadores de espora y cristales incluyen los bacilos formadores de esporas, los cuales producen cristales tóxicos (Klein y Jackson, 1992).

Las bacterias más importantes usadas en el control biológico de los insectos son aquellas que cuando esporulan forman cristales de proteínas tóxicas, que lo son en alto grado principalmente para diversos lepidópteros, pero al parecer inocuos para otras formas de vida. En el caso de los patógenos obligados del género *Bacillus*, que presentan un estrecho rango de hospederos e infectan sólo a ciertos coleópteros, estropean el intestino del adulto o de la larva de modo tal que invaden la cavidad del cuerpo (Romero-Nápoles, 1983).

Bt es la bacteria que cuenta con perspectivas para el control de larvas de Melolonthidae, como el caso de la cepa *Buibui*, que es tóxica para larvas de *Popillia japónica* (Ohba et al., 1992; Alm et al., 1997), *Exomala orientalis* (Susuki et al., 1992 en Alm et al., 1997) y para diferentes especies del género *Anomala* (Ohba et al., 1992; Susuki et al., 1992, 1993, en Alm et al., 1997; Susuki et al., 1994; Hori et al., 1994) (Cuadro 5).

Del mismo modo, los microorganismos pertenecientes al género bacteriano *Serratia* han sido frecuentemente reportados como agentes patógenos de insectos (Grimont et al., 1979 en Núñez-Valdéz, 1993) y ciertas potencialidades han sido sugeridas para ser usados como mecanismo de control biológico de los mismos (Steinhaus, 1959 en Núñez-Valdéz, 1993). Destaca en este sentido *Serratia entomophila*, que ha sido reconocida como agente causal de la enfermedad ambarina en larvas de *Costeiytra zealandica* en Nueva Zelanda (Jackson et al., 1993) (Cuadro 5).

4. Hongos

Así como las bacterias, muchos de los hongos asociados con insectos no son verdaderos patógenos o son patógenos sólo bajo ciertas condiciones; dependen en alto grado del estado del tiempo y del microambiente que rodea al insecto blanco. Por esta razón en la mayoría de los casos no han sido dignos de confianza (Romero-Nápoles, 1983).

El compendio relativamente pequeño de trabajos que se concentran en la manipulación genética de hongos entomopatógenos, se han enfocado a dos de los géneros de hongos patógenos mejor ubicados, *Metarhizium* y *Beauveria*, los cuales contienen a las principales especies patogénicas contra escarabajos: *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Beauveria brongniartii*. La virulencia de estos hongos, envuelve diversos procesos: germinación, adhesión, penetración, invasión a las defensas del hospedero, multiplicación en la hemolinfa del insecto, producción de toxinas, modificación de la conducta del hospedero, esporulación y dispersión de esporas (Glare et al., 1992). A diferencia de los demás patógenos, infectan al hospedero directamente a través del integumento (Coulson y Witter, 1990). (Cuadro 5).

5. Protozoarios

Los protozoarios que afectan a los insectos pertenecen a varias clases, pero los del Orden Microsporidia son el grupo más importante. Dichos microorganismos no constituirán parte integral de ningún programa de manejo de plagas hasta que se obtenga más información básica acerca de su biología y efectividad como agentes microbianos. Además deben llevarse a cabo más pruebas con respecto a su inocuidad, ya que algunos miembros de este orden ocasionan enfermedades tanto en peces como en mamíferos (Coulson y Witter, 1990) (Cuadro 5).

6. Nemátodos

Aunque el potencial de los nemátodos para el control de insectos se ha estudiado por varios años, problemas con su producción en masa han limitado su uso. En los últimos años se han obtenido resultados alentadores al utilizar nemátodos de los géneros antes mencionados (*Steinernema* y *Heterorhabditis*) en combinación con *Bacillus thuringiensis* var. *japonensis* (cepa *Buibui*) para el control de larvas de Melolonthidae (Koppenhöfer & Kaya, 1997 en Koppenhöfer, 1999) (Cuadro 5).

7. Insectos entomófagos

Los insectos entomófagos se diferencian mucho entre sí en cuanto a sus hábitos de obtención de alimento; varían de típicos parásitos a depredadores, pero entre ambos extremos se puede encontrar una multitud de formas.

Los depredadores matan a su hospedero para alcanzar la madurez y son organismos de vida libre durante todo su ciclo vital (Coulson y Witter, 1990). Son teóricamente menos efectivos que los parasitoides. El depredador mata para alimentarse mientras que los parasitoides atacan para reproducirse. Su efectividad está reducida también por el difuso carácter en su ataque, el cual se extiende por un período largo, en comparación con el concentrado y más o menos obligado ataque del parasitoide (Crumb, 1929 en Romero-Nápoles, 1983).

Los depredadores tienen la apariencia de ser un instrumento especialmente ajustado a ayudar en el mantenimiento del balance natural, por estarse alimentando más o menos indiscriminadamente de la mayor parte de las especies plaga; en el cultivo de maíz, se ha reportado que las larvas de *Diabrotica* sp., *Phyllophaga* sp. y de varios elatéridos cuentan con enemigos naturales como hormigas, larvas de Carabidae y Cantharidae, las cuales pueden controlarlas parcial o totalmente (Romero, 1980 en Romero-Nápoles, 1983) (Cuadro 5).

La acción de los parasitoides sobre las plagas en el suelo, se ve obstaculizada por los hábitos de estas de acuerdo a las prácticas agrícolas. En este sentido, se consideran dos factores para el uso de parasitoides en una estrategia de control: la sincronización entre el parasitoide y el hospedero y la existencia de fuentes apropiadas para la alimentación de los parasitoides adultos.

En este sentido, destacan los integrantes del género *Tiphia*, que parasitan en especial a las larvas de escarabajo (Romero-Nápoles, 1983) (Cuadro 5).

Cuadro 5. Listado general de microorganismos entomopatógenos y entomófagos utilizados para el manejo de coleópteros de Melolonthidae y Scarabaeidae, a nivel mundial

MICROORGANISMO	HOSPEDERO	REFERENCIA
BACTERIAS		
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Oxythyrea funesta</i>	Robert et al., 1994
	<i>Phyllophaga spp.</i>	Crocker et al., 1982 en Shannon, 1994
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>japonensis</i> (Buibui)	<i>Popillia japonica</i>	Ohba et al., 1992; Alm et al., 1997
	<i>Exomala orientalis</i>	Susuki et al., 1992 en Alm et al., 1997
	<i>Anomala cuprea</i>	Ohba et al., 1992; Hori et al., 1994; Susuki et al., 1994
	<i>Anomala rufocuprea</i>	Ohba et al., 1992
	<i>Anomala albopilosa</i>	Susuki et al., 1992 en Susuki et al., 1994
	<i>Anomala daimiana</i>	Susuki et al., 1992 en Alm et al., 1997
	<i>Anomala shonfledi</i>	Susuki et al., 1992 en Alm et al., 1997
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>galleriae</i>	<i>Popillia japonica</i>	Sharpe, 1976
<i>Bacillus popilliae</i>	<i>Papuana uninodis</i>	Theunis & Alocilí, 1999
	<i>Popillia japonica</i>	Romero-Nápoles, 1983; Crocker & Grimser, 1982 en Rodríguez-del-Bosque, 1988;
<i>Bacillus fibourgensis</i>	<i>Melolontha melolontha</i>	De Bach, 1979; Burges & Hussey, 1971 en Romero-Nápoles, 1983;
<i>Serratia entomophila</i>	<i>Costelytra zealandica</i>	Trought et al., 1982 & Grimont et al., 1988 en Glare et al., 1992; Villalobos et al., 1993; Shannon, 1994
	<i>Rhizotrogus majalis</i>	Shannon, 1994
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Phyllophaga anxia</i> <i>Phyllophaga smithii</i>	Shannon, 1994
<i>Diplococcus sp.</i>	(<i>Lachnostema</i> (= <i>Ph. consanguinea</i>))	Shannon, 1994
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Phyllophaga sp.</i> <i>Phyllophaga anxia</i>	Shannon, 1994

... continuación Cuadro 5

MICROORGANISMO	HOSPEDERO	REFERENCIA
HONGOS		
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Phyllophaga vicina</i> <i>Phyllophaga menetriesi</i>	Shannon et al., 1993
<i>Beauveria sp.</i>	<i>Phyllophaga menetriesi</i>	Shannon, 1994
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	Shannon, 1994
<i>Beauveria brongniartii</i>	<i>Melolontha spp.</i> <i>Melolontha melolontha</i> <i>Melolontha hippocastani</i>	Zimmermann, 1992 en Shannon, 1994; Shannon, 1994
VIRUS		
<i>Virus Oryctes (Or V)</i>	<i>Oryctes rhinoceros</i>	Glare & Crawford, 1992 Zelazny et al., 1992
Grupo Poxviridae	<i>Anomala cuprea</i>	Katagiri et al., 1975; Martignoni & Iwai, 1981; Goodwin et al., 1991 (todas las referencias anteriores, citadas en Glare & Crawford, 1992)
	<i>Phyllophaga pleei</i>	Martignoni & Iwai, 1981 en Glare & Crawford, 1992
Grupo Iridoviridae	<i>Phyllophaga anxia</i>	Propawski & Yule, 1990 en Glare & Crawford, 1992
Grupo Iridoviridae (Virus iridiscente Cz IV); Nodaviridae Grupo C Baculoviridae	<i>Costelytra zealandica</i>	Kalmakoff et al., 1972; Dearing et al., 1980; Martignoni & Iwai, 1981; Crawford et al., 1985; Hess et al., 1991; Scotti & Fradericken, 1987 (todas las referencias anteriores, citadas en Glare & Crawford, 1992)
Grupos Parvoviridae, Poxviridae e Itriviridae	<i>Melolontha melolontha</i>	Steinhaus & Leutenegger, 1963; Vago, 1963; Bergoin et al., 1971; Van der Geest & Van der Laan, 1971; Goodwin et al., 1991; Martignoni & Iwai, 1981; (todas las referencias anteriores, citadas en Glare & Crawford, 1992)
Grupo C Baculoviridae	<i>Strategus aloeus</i>	Lomer, 1987 en Glare & Crawford, 1992

... continuación Cuadro 5

MICROORGANISMO	HOSPEDERO	REFERENCIA
NEMATODOS		
<i>Steinernema sp.</i>	<i>Phyllophaga menetriesi</i>	Caroline Smith, CATIE (datos no publicados) en Shannon, 1994
<i>Steinernema glaseri</i>	<i>Phyllophaga vicina</i> <i>Phyllophaga obsoleta</i>	Caroline Smith, CATIE, datos no publicados en Shannon, 1994
<i>Steinernema glaseri</i> (en combinación con Bt)	<i>Anomala orientalis</i>	Koppenhöfer et al., 1999
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i> (en combinación con Bt)	<i>Cyclocephala hirta</i> <i>Cyclocephala pasadenae</i>	Koppenhöfer & Kaya, 1997 en Koppenhöfer et al., 1999; Koppenhöfer et al., 1999;
<i>Heterorhabditis bacteriophora</i>	<i>Popillia japonica</i>	Gaugler et al., 1994
	<i>Phyllophaga hirticula</i>	Forschler & Gardner, 1991 en Shannon, 1994
<i>Mikolitzkyia aerivora</i>	<i>Phyllophaga spp.</i>	Romero-Nápoles, 1983
<i>Neoplectane glaseri</i>	<i>Popillia japonica</i> <i>Phyllophaga spp.</i>	Glaser & Fox, 1930 en Romero-Nápoles, 1983
RICKETTSIAS		
<i>Rickettsiella popilliae</i>	<i>Popillia japonica</i>	Dutky & Gooden, 1952; Romero-Nápoles, 1983; Hanula y Andreadis, 1988 (todas las referencias anteriores, citadas en Jackson & Glare, 1992)
	<i>Phyllophaga anxia</i> <i>Phyllophaga ephillida</i>	Dutky & Gooden, 1952 en Jackson & Glare, 1992
	<i>Cyclocephala borealis</i>	Hanula & Andreadis, 1988 en Jackson & Glare, 1992
<i>Rickettsiella melolontha</i>	<i>Melolontha melolontha</i>	Hurpin, 1962; Niklas, 1963 en Krieg, 1971
	<i>Melolontha hippocastani</i>	Hurpin, 1962; Niklas, 1963 en Krieg, 1971
	<i>Amphimallon majalis</i>	Hurpin, 1962; Niklas, 1963 en Krieg, 1971
	<i>Anomala dubia</i>	Hurpin, 1962; Niklas, 1963 en Krieg, 1971
	<i>Anomala hortícola</i>	Niklas, 1963 en Krieg, 1971

... continuación Cuadro 5

MICROORGANISMO	HOSPEDERO	REFERENCIA
PROTOZOARIOS		
<i>Actinocephalus</i> sp.	<i>Popillia japonica</i>	Kowalczyk, 1938 en Hanula & Andreadis, 1992
<i>Euspora</i> sp. <i>Euspora zealandica</i>	<i>Costelytra zealandica</i>	Allison, 1969 en Hanula & Andreadis, 1992
<i>Monocystis</i> sp.	<i>Melolontha melolontha</i>	Weiser & Wille, 1960; Weiser, 1963; Hurpin, 1971 (todas las referencias anteriores, citadas en Hanula & Andreadis, 1992)
<i>Pseudomonocystis</i> <i>hopliae</i>	<i>Hoplia</i> sp. <i>Melolontha melolontha</i>	Weiser, 1977 en Hanula & Andreadis, 1992
<i>Stictospora costelytrae</i>	<i>Costelytra zealandica</i>	Allison, 1969 en Hanula & Andreadis, 1992
Familia Gregarinidae (especies no descritas)	<i>Popillia japonica</i> <i>Anomala orientalis</i> <i>Macrodactylus subspinosus</i> <i>Cyclocephala borealis</i>	Hanula & Andreadis, 1988 en Hanula & Andreadis, 1992
INSECTOS ENTOMÓFAGOS		
ORDEN DIPTERA		
<i>Sparnopolius iherminieri</i> (Familia Bombyliidae)	<i>Phytophaga</i> spp.	Davis, 1919 en Hanson, 1994
<i>Pyrophorus luminosus</i> (Familia Elateridae)	<i>Phytophaga</i> spp.	Wolcott, 1950 en Hanson, 1994
<i>Promachus yesonicus</i> (Familia Asilidae)	<i>Phytophaga</i> spp.	Knutson, 1972 en Hanson, 1994
<i>Pyrgota undata</i> (Familia Pyrgotidae)	<i>Phytophaga</i> spp.	Davis, 1919 en Hanson, 1994
<i>Dexia ventralis</i> (Familia Tachinidae)	<i>Phytophaga</i> spp. <i>Anomala</i> spp.	Clausen, 1940 en Hanson, 1994
ORDEN HYMENOPTERA		
<i>Tiphia</i> sp. (Familia Tiphidae)	<i>Phytophaga</i> spp.	Romero-Nápoles, 1983 Hanson, 1994;
Familia Formicidae	<i>Phytophaga</i> spp.	Romero-Nápoles, 1983
ORDEN COLEOPTERA		
Familia Carabidae	<i>Phytophaga</i> spp.	Lim et al., 1981 en Hanson, 1994; Romero-Nápoles, 1983

8. Entomopatógenos y entomófagos potenciales de la gallina ciega en México

Hasta la fecha son escasos los reportes de la utilización de entomopatógenos para el control de la gallina ciega en el mundo. Destacan algunos informes alentadores provenientes en su mayoría de los Estados Unidos, Nueva Zelanda y Japón, destacándose el uso de bacterias como los agentes microbianos más viables para un programa de control.

Las bacterias *Serratia spp.* (en contra de larvas de *Costelytra zealandica*), *Bacillus popilliae* (en contra de larvas de *Popillia japónica*) y *Bt* cepa *Buibui* (contra larvas del género *Anomala*) son claros ejemplos del avance en esta búsqueda (Cuadro 5).

En México, no existe todavía un pleno convencimiento de la utilidad de este tipo de control. Sin embargo, desde hace algunos años se han iniciado diversos esfuerzos para impulsar esta actividad en beneficio de la agricultura mexicana.

En el caso de los insectos entomófagos, la larva endoparásita de *Dexia sp.* (Diptera: Tachinidae) se reporta como un enemigo natural de *Phyllophaga rubella* en el Estado de México (Islas, 1964). En jardines ornamentales de Chapultepec, Distrito Federal y Jalapa, Veracruz, el himenóptero *Tiphia spp.* puede alcanzar niveles de parasitismo por encima del 50% (Villalobos, 1992). En Tamaulipas, se han detectado dípteros (pertenecientes a las familias Asiliidae y Bombyliidae), himenópteros (*Tiphia sp.*) y coleópteros (familia Carabidae) como enemigos naturales de larvas de *Phyllophaga trichodes* y *Ph. misteca* (Villalobos, 1999).

Hongos entomopatógenos de los géneros *Metarhizium*, *Beauveria* y *Penicillium* (Villalobos, 1999), nemátodos del género *Heterorhabditis* (Hernández-García y Alatorre, en pub.) además de bacterias de los géneros *Bacillus* y *Serratia* (Villalobos, 1999), son los microorganismos más utilizados en la actualidad que se encuentran en fase de experimentación en nuestro país. Entre ellos destaca en la actualidad *Bt*, que ha ofrecido resultados sumamente alentadores.

En el cuadro 6 se detalla la información sobre estos grupos de microorganismos.

Cuadro 6. Listado de microorganismos con potencial como entomopatógenos y entomófagos de coleópteros Melolonthidae en México (Adaptado de Villalobos, 1997)

MICROORGANISMO	ESPECIE DE MELOLONTHIDAE HOSPEDERA	ESTADIO ATACADO	ORIGEN DE LARVAS DE MELOLONTHIDAE	REPORTE
BACTERIAS				
<i>Bacillus spp.</i>	<i>Phyllophaga obsoleta</i>	larva	Cuernavaca, Morelos	Núñez-Valdéz et al., 1999 (en publicación)
	<i>Phyllophaga blanchardi</i>	larva	Cuernavaca, Morelos	Núñez-Valdéz et al., 1999 (en publicación)
	<i>Anomala castaniceps</i>	larva	Cuernavaca, Morelos	Núñez-Valdéz et al., 1999 (en publicación)
	<i>Anomala donovani</i>	larva	Tlayacapan, Morelos	Núñez-Valdéz et al., 1999 (en publicación)
<i>Paenibacillus (Bacillus) popillae</i>	<i>Phyllophaga ravidia</i>	larva	Estado de Michoacán	Nájera et al., 2000 (en publicación)
	<i>Phyllophaga vetula</i>	larva		
<i>Bacillus popillae</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Bacillus popillae</i> tipo A	<i>Phyllophaga misteca</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Bacillus sphaericus (Bacillus spp. - cepa IM22.a)</i>	<i>Anomala donovani</i>	larva	Tlayacapan, Morelos	Barreda, 2000; Núñez-Valdéz et al., 2000 (en publicación)
	<i>Phyllophaga blanchardi</i>	larva	Cuernavaca, Morelos	Núñez-Valdéz et al., 2000 (en publicación)
<i>Bacillus thuringiensis</i>	<i>Phyllophaga ravidia</i>	larva	Cuernavaca, Morelos	Presente estudio
	<i>Anomala inconstans</i>	larva		
	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Presente estudio; Barreda, 2000

MICROORGANISMO	ESPECIE DE MELOLONTHIDAE HOSPEDERA	ESTADIO ATACADO	ORIGEN DE LARVAS DE MELOLONTHIDAE	REPORTE
<i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>japonensis</i> (Bulbul)	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Presente estudio; Barrada, 2000
<i>Serratia</i> spp.	<i>Phyllophaga trichodes</i> <i>Phyllophaga misteca</i>	larva larva	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Serratia marcescens</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Serratia entomophila</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Calderón, 1988
HONGOS				
<i>Beauveria</i> spp.	<i>Macroductylus</i> spp.	larva adulto	Chiconquiaco, Veracruz	Villalobos et al., (en prep.) en Villalobos, 1992
<i>Beauveria bassiana</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
	<i>Phyllophaga misteca</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
	<i>Diploctaxis turpicola</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Meterhizium anisopliae</i>	<i>Phyllophaga vetula</i>	larva adulto	Chapultepec, Distrito Federal	Villalobos y Heredia (obs. pers.), en Villalobos, 1992
	<i>Phyllophaga blanchardi</i>	larva adulto	Chapultepec, Distrito Federal	Villalobos y Heredia (obs. pers.), en Villalobos, 1992
	<i>Macroductylus mexicanus</i>	larva adulto	Chapultepec, Distrito Federal	Villalobos y Heredia (obs. pers.), en Villalobos, 1992

MICROORGANISMO	ESPECIE DE MELOLONTHIDAE HOSPEDERA	ESTADIO ATACADO	ORIGEN DE LARVAS DE MELOLONTHIDAE	REPORTE
<i>Metarhizium anisopliae</i>	<i>Anomala inconstans</i>	larva adulto	Chapultepec, Distrito Federal	Villalobos y Heredia (obs. pers.), en Villalobos, 1992
	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva adulto	Laguna Verde, Veracruz	Villalobos, 1991 en Villalobos, 1992
	<i>Phyllophaga ravida</i>	larva adulto	Laguna Verde, Veracruz	Villalobos, 1991 en Villalobos, 1992
	<i>Anomala megalops</i>	larva adulto	Laguna Verde, Veracruz	Villalobos, 1991 en Villalobos, 1992
	<i>Cyclocephala immaculata</i>	larva adulto	Laguna Verde, Veracruz	Villalobos, 1991 en Villalobos, 1992
	<i>Cotinis mutabilis</i>	larva adulto	Irapuato, Guanajuato	Morón e Ibarra (com. pers.), en Villalobos, 1992
	<i>Macroductylus spp.</i>	larva adulto	Chiconquiaco, Veracruz	Villalobos et al., (en prep.) en Villalobos, 1992
	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
	<i>Phyllophaga misteca</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
	<i>Diptotaxis turgidula</i>	larva, pupa adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999
<i>Cordyceps sp.</i>	<i>Strategus sp.</i>	larva adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos y Heredia (obs. pers.), en Villalobos, 1992
<i>Penicillium sp.</i>	<i>Diptotaxis turgidula</i>	adulto	El Cielo, Tamaulipas	Villalobos, 1999

... continuación Cuadro 6

MICROORGANISMO	ESPECIE DE MELOLONTHIDAE HOSPEDERA	ESTADIO ATACADO	ORIGEN DE LARVAS DE MELOLONTHIDAE	REPORTE
NEMATODOS				
<i>Heterorhabditis sp.</i>	<i>Phyllophaga rubella</i>	larva	Veracruz	Hernández-García y Alatorre, 2000 (en publicación)
INSECTOS ENTOMÓFAGOS				
ORDEN DIPTERA				
<i>Dexia sp.</i>	<i>Phyllophaga rubella</i>	larva	Estado de México	Islas, 1964
<i>Anthrax sp.</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	pupa	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999
Familia Bombyliidae	<i>Phyllophaga trichodes</i>	pupa	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999
	<i>Phyllophaga misteca</i>	pupa	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999
ORDEN HYMENOPTERA				
<i>Thipia sp.</i>	<i>Phyllophaga trichodes</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999
	<i>Phyllophaga misteca</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999
ORDEN COLEOPTERA				
Familia Carabidae	<i>Phyllophaga misteca</i>	larva	El Cielo, Tamaulipas	Vitalobos, 1999

B.2. El bioensayo: propiedades e importancia en la investigación científica

A través del tiempo se han propuesto diversas definiciones para el término bioensayo, y como ocurre con cualquier otro término científico, estas son fuertemente influenciadas por el campo del conocimiento en donde se este aplicando. Busvine (1971) menciona que el término bioensayo, en el sentido amplio, cubre todos los experimentos en los que la potencia de un insecticida se mide con referencia a una colonia estandarizada de insectos, además de abarcar aquellos casos en los que el insecto se usa como una herramienta para medir pequeñas cantidades de insecticida, sobre un sustrato dado (en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994). En términos generales, el bioensayo es un conjunto de procedimientos en el que se determina la cantidad o fuerza de un agente o estímulo mediante la respuesta de un sujeto (Hubert, 1980 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994), y representa la base para nuevos análisis a otros niveles.

Existen dos tipos básicos de bioensayo: el directo y el indirecto. El ensayo directo involucra la medición de la cantidad exacta de tóxico que produce un determinado nivel de intoxicación en un individuo; en general involucra el incremento de la dosis hasta un punto crítico, estudiando un solo individuo, en este tipo de pruebas la variable de interés es la dosis. El ensayo indirecto consiste en dar a grupos de organismos dosis estándar, registrando las respuestas obtenidas en cada caso; en estas pruebas interesa el número de respuestas en cada nivel de dosis. En los bioensayos indirectos la respuesta puede ser de dos tipos: cuantitativa (susceptible de medición) o cualitativa (respuesta de todo o nada). De una manera simple puede decirse que el de tipo de cualitativo es el experimento de mayor empleo en toxicología, ya que involucra la determinación de la relación entre la dosis y el porcentaje de respuesta (Finney, 1971; Hubert, 1980 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

El principal objetivo de un bioensayo, es la estimación del nivel de estímulo necesario para obtener respuesta en determinada proporción de individuos. Por razones estadísticas, el problema se reduce a la determinación del estímulo necesario para obtener una respuesta de 50% de los organismos de prueba; este valor se denomina "dosis letal media" (DL_{50}) y es una expresión cuantitativa de la tolerancia de una especie en particular, a un insecticida, bajo ciertas condiciones experimentales. Al mismo tiempo, este valor es una medida de la toxicidad del insecticida usado; a mayor valor de DL_{50} menor toxicidad y viceversa. Existen expresiones alternativas a la DL_{50} como CL_{50} (concentración letal media), TL_{50} (tiempo letal medio), DE_{50} (dosis efectiva media), etc., cuyo empleo varía de acuerdo con el procedimiento de bioensayo empleado (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

1. La relación dosis-respuesta en un bioensayo

La relación dosis-respuesta está constituida por dos componentes: el estímulo y el sujeto. El estímulo se aplica al sujeto como una dosis (una intensidad especificada en unidades de concentración, peso u otra unidad apropiada) administrada bajo condiciones ambientales tan controladas como sea posible.

Como resultado de ello, el sujeto manifiesta una respuesta (desarrollo, cambio de color, debilidad, etc.), que en caso de ser cualitativa, su ocurrencia o ausencia dependerá de la intensidad del estímulo.

La base de la relación dosis-respuesta radica en la determinación experimental del intervalo de concentraciones de una sustancia química en el que se da un efecto gradual entre el extremo en el que la dosis es tan pequeña que no produce efecto, hasta aquel en el que es tan alta, que produce la muerte de todos los organismos (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

Los datos que resultan de un bioensayo cualitativo son: dosis empleada, número de individuos tratados y número de individuos que responden al tratamiento.

2. Importancia del bioensayo en el desarrollo de resistencia de un insecto

La ruta que sigue el desarrollo de resistencia de un insecto bajo tratamiento puede presentar tres fases:

- a) la determinación de la efectividad del plaguicida contra la especie en cuestión
- b) el período en el que la selección de genotipos resistentes no es intensa (debido a que el tóxico no se ha aplicado extensivamente, o que el organismo no se haya expuesto intensamente a plaguicidas toxicológicamente relacionados con este)
- c) la fase en que existen razas resistentes del organismo en cuestión

En estas tres fases el bioensayo juega un papel determinante. En la primera constituye una rutina en los laboratorios que buscan nuevas moléculas para el control de plagas o nuevas aplicaciones para plaguicidas ya establecidos; en este caso se determina si el tóxico tiene o no efecto sobre cierto organismo, o bien se determina la potencia relativa de un plaguicida respecto a otro.

En las otras dos fases, el bioensayo tiene el papel de herramienta de monitoreo de resistencia; mediante este se realiza una inspección constante de la pérdida de susceptibilidad o del nivel de resistencia en una población plaga con respecto a valores de DL_{50} previamente determinados (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

La determinación de resistencia sólo tiene validez científica si es avalada por un bioensayo, en un proceso conocido como "documentación de resistencia" (Georghiou y Lagunes, 1991 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

De manera similar, los resultados de un bioensayo para detección de resistencia no pueden ser utilizados para determinar la dosis a emplear en campo, ya que una determinación de laboratorio no toma en cuenta las pérdidas producidas por arrastre, fotodescomposición, termodegradación, escape del insecto, etc.

En todo caso, la aplicación de campo de los resultados de un bioensayo para detección de resistencia es la posibilidad de seleccionar aquellos productos tóxicos para los que la población aún no desarrolla resistencia (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

3. Factores que afectan los resultados del bioensayo

La respuesta de un organismo a un tóxico es característicamente específica, y puede variar entre razas, estados y sexos dentro de una misma especie, y ser afectada por el procedimiento experimental o el método empleado para medir la respuesta (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

a) Factores inherentes al organismo de prueba

Existen características relacionadas íntimamente a la biología del insecto como fase de desarrollo, edad, peso y sexo de los individuos de prueba que influyen definitivamente sobre la respuesta de los organismos en el bioensayo.

- Edad y estado de desarrollo

Las diferencias en susceptibilidad a insecticidas de los estados sucesivos del ciclo vital de los insectos se deben presumiblemente a los cambios en anatomía, fisiología y tamaño por los que pasan. Por esta razón, las diferencias en susceptibilidad se manifiestan más en individuos con metamorfosis completa que en los que presentan metamorfosis parcial. Del mismo modo, la susceptibilidad en cada etapa en la vida del insecto está afectada por diferentes causas: desarrollo y cambios asociados a la muda en larvas y ninfas; reorganización anatómica y cambios en el metabolismo en huevos y pupas y finalmente, cambios en los hábitos alimenticios, madurez sexual y edad del adulto (Busvine, 1971 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

- Sexo

De manera general, en insectos, los machos son más susceptibles a insecticidas que las hembras (Busvine, 1971 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

b) Factores inherentes al procedimiento experimental

El protocolo para cada bioensayo contiene una serie de especificaciones que indican el tratamiento que se dará al organismo durante el desarrollo del experimento y después de este. La combinación de tales factores repercuten directamente en los resultados del ensayo y caracterizan a cada procedimiento.

- Factores ambientales y alimentación

A pesar de que sabe que la temperatura y humedad relativa tienen cierto efecto sobre los resultados del bioensayo, la manera mediante la cual se produce este efecto sobre el insecto, el insecticida o ambos, no ha sido satisfactoriamente clarificada.

En el caso de la iluminación, esta puede modificar el comportamiento del insecto, lo que puede influir en la sobrevivencia directamente al afectar la tasa metabólica, o bien influir indirectamente en los bioensayos en que el insecto incrementa la dosificación recibida al desplazarse sobre una superficie tratada.

Con respecto a la dieta, la cantidad y calidad de esta puede afectar el tamaño y la capacidad de sobrevivencia del insecto, además de que puede existir una diferencia en la tolerancia entre individuos recién alimentados y aquellos que se han mantenido sin alimento por un tiempo (Busvine, 1971 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

- Método de exposición

Se recomienda seleccionar una fase apropiada del ciclo biológico del insecto a tratar y elegir un tipo apropiado de bioensayo para medir la respuesta. El bioensayo más satisfactorio será aquel que ofrezca en los resultados la menor heterogeneidad, la pendiente más pronunciada y el menor valor DL_{50} (Champ & Dyte, 1976 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

La manera de exponer el organismo de prueba al tóxico es muy variada; de manera general se pueden establecer tres métodos principales: aplicación tópica, fumigación y exposición residual. La aplicación tópica consiste en la deposición de una cantidad conocida del tóxico sobre el cuerpo del organismo. La fumigación se refiere a la confinación del organismo en un contenedor cerrado donde se libera un tóxico que ejerce acción tóxica en su fase de vapor. El método residual consiste en la exposición del organismo a un ambiente contaminado con cierta concentración de tóxico (Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994).

A pesar de lo laboriosos del procedimiento, la aplicación tópica es el método más empleado para detectar resistencia.

- Tiempo de evaluación

El tiempo que transcurre entre el inicio del tratamiento y la evaluación de la respuesta, influye en el tipo y grado de esta última. La exposición al insecticida puede ser continua o puede establecerse un periodo limitado de exposición seguido de un periodo de recuperación que tiene una duración suficiente para que se establezca la respuesta (Champ & Dyte, 1976 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994). El tiempo de exposición depende del tipo de bioensayo y también de las características de acción del insecticida.

- Tamaño de muestra

Para obtener una estimación confiable en una regresión dosis-mortalidad, se propone una muestra con un mínimo de 120 individuos (Robertson et al., 1984 en Lagunes-Tejeda y Vázquez-Navarro, 1994). Sin embargo, existen limitantes metodológicas para obtener tal cantidad de individuos, como es el caso de las gallinas ciegas, que son especialmente difíciles de criar y de mantener en condiciones de laboratorio (como en el presente estudio).

Por ello muchas veces no es posible contar con el número ideal de ejemplares para realizar un bioensayo, y sólo resta el utilizar una muestra lo suficientemente confiable para obtener diferencias estadísticas significativas (prueba de χ^2) entre los tratamientos y el testigo (Delgado, com. pers.).

B.3. Sustentabilidad y la búsqueda de una agricultura sustentable

1. Definición y principios

La definición de sustentabilidad depende del contexto en el cual es utilizado, ya que las implicaciones del concepto varían dependiendo del enfoque propuesto (Shearman, 1990 en Meyer & Helfman, 1993). Desde un punto de vista ecológico, en acuerdo con la Sociedad Ecológica de América (ESA), la sustentabilidad es el manejo de prácticas que no degradarán el sistema en explotación o algunos sistemas adyacentes (Lubchenco et al., 1991 en Meyer & Helfman, 1993). Este enfoque se ha incorporado y enriquecido para afrontar los problemas contemporáneos de la agricultura.

Una agricultura sustentable se fundamenta en el empleo de métodos de producción que protejan al medio ambiente y a la biodiversidad, y a la vez conserven los recursos naturales para las futuras generaciones. De acuerdo con Pimentel et al. (1989), una agricultura sustentable de bajos insumos expresa principios ecológicos tales como:

- a) adaptar el sistema agrícola al medioambiente de la región, incluyendo el suelo, agua, clima y la biota presente en el sitio;
- b) optimizar el uso de recursos biológicos, químicos y físicos en el agroecosistema
- c) desarrollar estrategias para minimizar sus efectos negativos sobre el medio ambiente

Aún cuando este enfoque holístico es muy complejo, se puede simplificar parcialmente al concentrar la atención en 4 factores principales: nutrientes del suelo, agua, energía y plagas. El objetivo es conservar los nutrientes del suelo y el agua, mientras que simultáneamente se fomenta la presencia de organismos benéficos y se suprime a las plagas. Al conservar el suelo y los recursos acuíferos, se reducen los insumos de fertilizantes comerciales y la irrigación, con lo cual se reducen los costos de producción. La erosión del suelo afecta adversamente la productividad de los cultivos al reducir la disponibilidad de agua, de nutrientes inorgánicos, de la materia orgánica y al restringir la profundidad de enraizamiento en la medida que el suelo se agota (Pimentel et al., 1989).

Es principalmente la pérdida de agua por escurrimiento en un suelo erosionado lo que reduce la productividad de los cultivos. Tanto la erosión provocada por el viento como la provocada por el agua, reducen también la capacidad de retención de agua del suelo al llevarse la materia orgánica y las partículas de suelo más finas. La escasez de nutrientes inorgánicos es otro de los factores que limitan sustancialmente la productividad de los cultivos. La erosión no se lleva todos los nutrientes de manera uniforme.

Varios estudios han demostrado que el material erosionado es normalmente de 1.3 a 5 veces más rico en material orgánico que el suelo remanente. Por otra parte, una estrategia más holística de manejo podría reducir las plagas utilizando una combinación de métodos de control en lugar de una táctica unilateral tal como el empleo de pesticidas. El diseñar y manejar el agroecosistema, teniendo en mente la idea de cuidar tanto el cultivo como el medioambiente contribuirá también a conservar los recursos suelo y agua al mismo tiempo que se fomentan condiciones desfavorables para las plagas (Pimentel et al., 1989).

2. Recursos biológicos

Existen muchas especies en la biota natural cuyas múltiples funciones son esenciales para la agricultura: la fijación de nitrógeno, la descomposición de desechos, el reciclaje de nutrientes, la protección de los cultivos y el ganado al ataque de plagas, la polinización de los cultivos, la conservación de los recursos suelo y agua, así como para la preservación del material genético para el cruzamiento de cultivos o el ganado.

El uso de algunas leguminosas, además de contribuir a fijar cantidades importantes de nitrógeno, sirve como una protección viviente para el suelo de la erosión eólica e hídrica, o bien para reducir las malas hierbas o insectos plaga (Villalobos, 1995).

Un suelo fértil, bien conservado, puede considerarse en gran parte, como un organismo vivo.

El contenido de materia orgánica en un suelo agrícola debería ser al menos de un 4% en ambientes templado-húmedos para asegurar la existencia de biota suficiente y así descomponer desechos y reciclar los nutrientes; también deberá existir en este suelo una población adecuada de lombrices e insectos para una eficiente aereación y un buen drenaje de agua. La abundancia de la biota del suelo está directamente relacionada con la cantidad de la materia orgánica en el suelo. Es aquí donde toma relieve el establecimiento de tácticas de conservación de suelo (labranza mínima, formación de surcos, aplicación de estiércol, fabricación de compostas, etc.), que además de fomentar la biota, permite el incremento de la productividad del suelo (Villalobos, 1995).

3. La materia orgánica como herramienta de sustentabilidad

La materia orgánica del suelo (MOS) es una mezcla compleja de un amplio espectro de compuestos orgánicos que tienen sus contrapartes en los tejidos biológicos. Puede ser definida como un amplio espectro de constituyentes orgánicos que incluyen la biomasa microbiana del suelo, restos de plantas, animales o microorganismos parcialmente descompuestos, y sustancias húmicas (Villalobos et al., 1997).

En general, la MOS comprende una fracción biótica (biomasa microbiana) y tres fracciones abióticas que presentan diferentes tasas de descomposición (Goh, 1980 en Villalobos et al., 1993):

- a) una fracción soluble que los microorganismos descomponen rápidamente y está lista para incorporarse a las cadenas biológicas
- b) una fracción también degradable pero a una tasa mucho menor debido a la complejidad del sustrato o a sus mecanismos protectores
- c) una fracción que es sumamente resistente a la degradación debido a la complejidad estructural y/o a los mecanismos protectores que conllevan a su estabilidad en el suelo

La fracción de la MOS que sufre cambios y está disponible para su uso inmediato por parte de la biota edáfica podría estar jugando un papel crítico en la expresión del daño causado por gallinas ciegas. Esta fracción estaría directamente relacionada con la actividad alimenticia de la planta, el insecto y con los entomopatógenos. Su carencia en el suelo sería un factor determinante en el daño causado por la gallina ciega (Villalobos et al., 1993).

La manera como la materia orgánica modifica favorablemente la estructura del suelo es mediante la formación de agregados. En estos agregados de suelo la materia orgánica actúa como material cementante de las partículas minerales de suelo. También es un elemento importante para mantener las propiedades químicas del suelo tales como la capacidad de intercambio catiónico y el pH, además de presentar un efecto amortiguador de los cambios del pH en un rango muy amplio (Villalobos, 1995). Por otro lado, la MOS es la mayor fuente de nutrientes requeridos por las plantas. Aproximadamente un 95% del nitrógeno y del 15 al 80% del fósforo en la superficie del suelo se encuentra en la MOS.

Se ha observado que algunos cultivos crecidos en suelos con un buen contenido de materia orgánica son más vigorosos, más saludables y tiene mayor contenido nutricional que cultivos que crecen en suelos tratados con cantidades equivalentes de nutrientes inorgánicos provenientes de fertilizantes (Villalobos, 1995). De la misma manera se ha sugerido que la MOS tiene un efecto positivo sobre los enemigos naturales. El contenido y efectividad de la bacteria *Serratia entomophila*, agente causal de la enfermedad amarillina en larvas de *Costelytra zealandica*, fue superior cuando se compararon dos suelos con una diferencia del 2% en su contenido de materia orgánica (Villalobos et al. 1993). Se ha detectado que las enfermedades en *C. zealandica* son el principal factor biótico de mortalidad en varias localidades de Nueva Zelanda. En esta especie, se ha calculado que sólo un 17% de los huevos depositados, en una generación anual, emergen como adultos bajo condiciones de campo. La mayor parte del 83% de la mortalidad restante ocurre en la fase larvaria (Cameron & Wigley, 1989 en Villalobos, 1995) y la función de la materia orgánica para generar reservorios de entomopatógenos puede jugar un papel fundamental en ello (Villalobos, 1995).

4. La agricultura convencional y la sustentable: aspectos económicos y ambientales

Tres de las dificultades principales que enfrenta la agricultura convencional son los elevados costos de producción, el serio problema de la degradación de los recursos naturales, así como la inestabilidad de los rendimientos y de los precios de los cultivos

Cuando se comparan los beneficios económicos y ambientales de cultivos producidos mediante prácticas de agricultura sostenible con otros producidos con métodos convencionales, es posible observar puntos favorables (Pimentel et al., 1989). Sin embargo, hay que reconocer que las estrategias de la agricultura sustentable pueden dar resultados positivos en algunos lugares, pero pueden ser menos efectivas en otros. Es por esta razón que debe tenerse un especial cuidado en seleccionar tecnologías apropiadas utilizando los recursos propios de la localidad. Un elemento importante a considerar es que la mayor parte de las evaluaciones comparativas entre una agricultura sustentable y una convencional toma en cuenta principalmente criterios económicos y poca atención se presta a aquellos aspectos que difícilmente pueden ser cuantificados, como son los efectos indirectos. Tampoco se consideran los valores culturales y religiosos de las poblaciones humanas en estudios sobre la rentabilidad económica de los cultivos (Villalobos, 1995). La agricultura sustentable no representa de ninguna manera un retorno a los métodos de la revolución preindustrial; sólo se trata de una combinación de las técnicas agrícolas tradicionales con las técnicas modernas. Los sistemas sustentables manejan equipo moderno, semillas calificadas, impulsan prácticas de conservación de agua y suelo y promueve las últimas innovaciones en alimentación y manejo de ganado. Además, se hace un especial énfasis en la diversificación y rotación de cultivos, en la regeneración del suelo y en el control natural de plagas (Reganold et al., 1990).