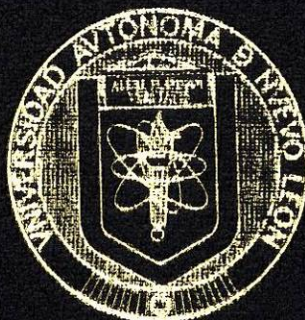


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



"ACTIVIDAD DE LA CEPA GM-1 DE Bacillus
thuringiensis Berliner EN Spodoptera
frugiperda (Smith)"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

PRESENTA
CARLOS OCHOA GOMEZ

MARIN, N. L.

DICIEMBRE DE 1983

T

SB601

02

C. 1



1080062249

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA



"ACTIVIDAD DE LA CEPA GM-1 DE Bacillus
thuringiensis Berliner EN Spodoptera
frugiperda (Smith)"

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
INGENIERO AGRONOMO PARASITOLOGO

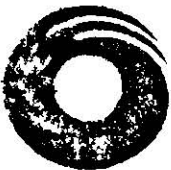
PRESENTA
CARLOS OCHOA GOMEZ

MARIN, N. L.

DICIEMBRE DE 1983

T
SB601
02

040 632
FA 13
1983



Biblioteca Central
Magna Solidaria

F. tesis



BURAU RANGEL FERRER
UANL
FONDO
TESIS LICENCIATURA

DEDICATORIA

A mis padres:

Sra. Simona Gómez de Ochoa.

Sr. Pedro Ochoa Aguirre.

*Con profundo agradecimiento por su amor y confianza
inquebrantable.*

A mis hermanos:

Gerardo

Irma

Jaime

José

Juan

María Candelaria

Raúl

Reynaldo

Rubén

Por su noble apoyo.

AGRADECIMIENTOS

A mis asesores:

Ing. Cuauhtémoc Núñez Ramos.

Q.B.P. Luis J. Galán Wong.

*Por sus acertados consejos y paciente dirección, que con
tribuyeron al término de este trabajo.*

Mi más sincero reconocimiento a :

Howard T. Dulmage, PhD

Por la desinteresada atención brindada en sus aportaciones y asesoría.

A todos aquellos compañeros y amigos partícipes de alguna manera en este trabajo.

I N D I C E

	Página
I. INTRODUCCION	i
II. LITERATURA REVISADA	1
2.1. Generalidades sobre el control microbiológico de insectos	1
2.1.1. Origen	1
2.1.2. En qué consiste el control microbial	3
2.1.3. Posibilidades en el futuro	5
2.1.4. Limitaciones del control microbial	7
2.1.5. Agentes de control microbial	8
2.1.6. El control microbial en México	12
2.2. <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner y control microbial . .	17
2.2.1. Descubrimiento	17
2.2.2. Identificación	21
2.2.2.1. Consideraciones generales sobre la denominación de <u>B. thuringiensis</u>	21
2.2.2.2. Posición taxonómica de <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner	25
2.2.2.3. Generalidades de la familia Bacillaceae	25
2.2.2.5. Características particulares de <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner	29
2.2.2.6. Características subespecíficas de <u>Bacillus thuringiensis</u>	29
2.2.2.7. <u>B. thuringiensis</u> GM-1	31
2.2.3. Naturaleza entomopatogénica	32
2.2.3.1. Distribución, habitat y nicho ecológico	32
2.2.3.2. Rango de hospederos	35
2.2.3.3. <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner como fuente de toxinas	37
2.2.4. El cristal parasporal y la toxina proteínica	40

2.2.4.1. Química y estabilidad del cristal	41
2.2.4.2. Solubilidad, aislamiento y caracterización de las subunidades tóxicas del cristal	42
2.2.4.3. Modo de acción	44
2.2.5. Producción de un insecticida a base de <u>Bacillus thuringiensis</u>	46
2.2.5.1. Medios de fermentación	46
2.2.5.2. Recuperación del complejo espóra-cristal	51
2.2.5.3. Estandarización de las recuperaciones	52
2.3. <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner en relación con <u>Spodoptera frugiperda</u> (Smith)	56
2.3.1. Generalidades sobre <u>Spodoptera frugiperda</u> (Smith)	56
2.3.1.1. Importancia económica, tipo de daño y distribución geográfica	56
2.3.1.2. Identificación	58
2.3.1.3. Hospederos, ciclo biológico y hábitos	61
2.3.1.4. Métodos de control	62
2.3.2. Estudios de la actividad de <u>B. thuringiensis</u> contra <u>S. frugiperda</u>	64
III. MATERIALES Y METODOS	66
3.1. Localización del estudio	66
3.2. Materiales utilizados	66
3.3. Metodología	68
3.3.1. Producción de los extractos	68
3.3.1.1. Desarrollo del inóculo	71
3.3.1.2. Siembra y fermentación de los medios estudiados	72
3.3.1.3. Recuperación del complejo espóra-cristal	74
3.3.2. Pruebas de toxicidad	74
3.3.2.1. Reproducción de <u>Spodoptera frugiperda</u> (Smith)	75
3.3.2.1.1. Incubación y desarrollo larvario	75
3.3.2.1.2. Emergencia de adultos y oviposición	78
3.3.2.2. Ensayos preliminares	79
3.3.2.3. Experimento con un diseño de bloques al azar	81
3.3.2.4. Bioensayos	82

3.4. Recolección de datos	82
3.5. Evaluaciones	84
3.5.1. Evaluación de las fermentaciones	84
3.5.2. Evaluación de la toxicidad de los extractos	86
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	88
4.1. Fermentaciones	88
4.1.1. Análisis estadístico de los rendimientos en peso - seco de extractos finales, obtenidos en los medios a base de jugo de agave	91
4.1.2. Análisis de las reducciones en los pesos de los me- dios durante su fermentación	94
4.2. Pruebas de toxicidad	98
4.2.1. Ensayos preliminares	98
4.2.2. Análisis de los resultados del experimento en blo- ques al azar	103
4.2.3. Resultados de los bioensayos	111
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	117
VI. RESUMEN	123
VII. BIBLIOGRAFIA	125

INDICÉ DE TABLAS Y FIGURAS

TABLA	Página
I Atributos deseables para entomopatógenos utilizados en el control microbial	4
II Preparaciones experimentales o comerciales de insecticidas microbiales	9
III Plagas agrícolas para las cuales la Dirección General de Sanidad Vegetal autoriza el uso de formulaciones comerciales, a base de los principios activos de <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner	16
IV Descubrimientos de las variedades de <u>Bacillus thuringiensis</u> Berliner	19
V Características diferenciales del grupo de especies correspondientes a la subdivisión IA del género <u>Bacillus</u>	23
VI Pruebas bioquímicas descritas en el manual de Bergey para <u>B. thuringiensis</u> y reacción de la cepa GM-1 a ellas	30
VII Medios utilizados por Dulmage en 1970, para la fermentación de doce variedades de <u>Bacillus thuringiensis</u>	49
VIII Insectos depredadores y parásitos de <u>Spodoptera frugiperda</u> (Smith)	63
IX Medios para la siembra y producción del inóculo	72
X Composición de los medios experimentales	73
XI Dieta de Shorei modificada, usada en la cría larvaria de <u>S. frugiperda</u>	77
XII Morfología observada en células de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 desarrolladas en dos tipos de medios	89
XIII Peso seco de los extractos producidos por la cepa GM-1 de <u>B. thuringiensis</u> , en cuatro medios a base de jugo de agave y harina de soya	91

XIV	Análisis de varianza de los rendimientos, en peso seco de extractos finales, obtenidos con la cepa GM-1 en los medios a base de jugo de agave y harina de soya	92
XV	Conteo de esporas de los extractos finales, producidos - en los medios a base de jugo de agave y harina de soya por la cepa GM-1 de <u>B. thuringiensis</u>	93
XVI	Relación entre la reducción del peso en los medios experimentales y su rendimiento, en peso seco de sus extractos, tras desarrollarse en ellos la cepa GM-1 de <u>B. thuringiensis</u>	95
XVII	Promedios de las reducciones de peso por medio y sus rendimientos, transformados a porcentajes	96
XVIII	Porcentajes de mortalidad obtenidos durante los ensayos preliminares, entre especies lepidópteras, con los extractos de la cepa GM-1 de <u>B. thuringiensis</u> , crecida en medios con jugo de agave y harina de soya	100
XIX	Reducción del peso en larvas de <u>S. frugiperda</u> , observada durante el ensayo preliminar de los extractos recuperados en la fermentación tres, de la cepa GM-1	101
XX	Resultados del experimento realizado bajo un diseño de bloques al azar, para determinar estadísticamente la actividad de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 en larvas de primer estadio de <u>S. frugiperda</u>	102
XXI	Larvas de <u>S. frugiperda</u> que sobrevivieron después de siete días, en dietas inoculadas a razón de 500 μ g/ml de alimento, con extractos de la cepa GM-1	104
XXII	Análisis de varianza para larvas de <u>S. frugiperda</u> , que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g de extractos de la cepa GM-1, por mililitro de dieta	104

XXIII	Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio en larvas de <u>S. frugiperda</u> , que sobrevivieron por siete días en dietas artificiales inoculadas, a razón de 500 μ g/ml, - con extractos de las cepas GM-1 y HD-1 de <u>B. thuringiensis</u>	108
XXIV	Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X + 1}$.	109
XXV	Comparación de medias de los pesos larvales en <u>S. frugiperda</u> , originadas por la actividad de los extractos de las cepas GM-1 y HD-1; y medias del peso larval por bloque, las que sugieren distintos grados de susceptibilidad a <u>B. thuringiensis</u> , en los diversos grupos larvales de <u>S. frugiperda</u> dispuestos por bloque	109
XXVI	Mortalidad larval de <u>S. frugiperda</u> , originada en dos bioensayos con las formulaciones de la cepa GM-1 y el estándar internacional HD-1-S-1971 de <u>B. thuringiensis</u>	112
XXVII	Datos de mortalidad y dosis de los bioensayos con <u>S. frugiperda</u> , transformados a la escala probit-log	114
XXVIII	Concentración letal media de los extractos de las cepas GM-1 y HD-1-S-1971, determinada mediante un análisis de regresión en unidades probit-log	116

FIGURAS

1	Etapas que comprende el desarrollo de un entomopatógeno hasta insecticida microbial	47
2	Diagrama de flujo de la metodología seguida en la producción de extractos y pruebas de toxicidad	69
3	Diagrama de flujo seguido en la producción de extractos	70
4	Diagrama de flujo seguido en la reproducción de <u>S. frugiperda</u>	76

5	Diagrama de flujo de las pruebas de toxicidad con la cepa GM-1 de <u>B. thuringiensis</u>	80
6	Datos registrados durante las fermentaciones de los medios y las pruebas de toxicidad de <u>B. thuringiensis</u> GM-1 en <u>S. frugiperda</u>	83
7	Evaluaciones de los datos obtenidos en las fermentaciones y las pruebas de toxicidad	85
8	Relación entre los porcentajes de rendimiento, en peso <u>se</u> co de los extractos finales y reducción del peso de los - medios de jugo de agave y harina de soya. [Histograma] . .	99
9	Actividad de la cepa GM-1 en contraste con el estándar <u>in</u> ternacional HD-1-S-1971	113
10	Líneas de regresión probit-log para la actividad de las cepas GM-1 y HD-1, durante los bioensayos	115

INTRODUCCION

El uso de insecticidas químicos para combatir plagas agrícolas, ha sido durante los últimos diez años una de las actividades más discutidas; los problemas de contaminación contemporánea, derivados de la bioacumulación y transferencia biológica de los organosintéticos recalcitrantes y lipofílicos, son en nuestros días de un dominio más amplio. Sin embargo, fue la resistencia desarrollada en insectos perjudiciales, a diversos parasiticidas, el fenómeno que influyó directamente en la entomología económica. Varias alternativas se han propuesto para tratar de establecer un adecuado sistema de protección de cultivos; no obstante, todas pueden agruparse esencialmente en dos clases: aquellas que se basan en un criterio económico, que consiste en un cuidadoso análisis de la relación riesgo-beneficio, para cada caso en que se utilicen insecticidas; y las que se fundamentan en el uso alternativo de distintos métodos de control.

Durante la pasada década, un auge considerable se produjo en el conocimiento y la práctica del empleo de microorganismos patógenos de insectos como agentes de control, una vez que las técnicas de microscopía electrónica aumentaron el poder de resolución a nivel ultracelular. Bacillus thuringiensis Berliner, a más de ochenta años de su descubrimiento, tuvo su mayor índice de utilidad en ese período; su alta especificidad y crecimiento saprofítico, son características fundamentales que determinaron, respectivamente, su empleo sin riesgos ecológicos y la factibilidad de su producción.

El gusano cogollero, Spodoptera frugiperda (Smith), es la principal plaga del maíz en México y en la que todavía, la forma más generalizada de control depende en una gran proporción de la aplicación de productos químicos. La marcada susceptibilidad de muchas especies de lepidópteros, a distintas variedades de B. thuringiensis, dan lugar a la posibilidad de encontrar alguna línea nativa virulenta en S. frugiperda. La cepa GM-1, - aislada recientemente en la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., -- fue reportada como patógena a larvas de primer estadio de esta plaga; - sin embargo, no existen antecedentes del o los medios utilizados para su fermentación, ni mucho menos la concentración letal media de los extractos obtenidos.

El presente trabajo se planificó con el propósito de conseguir un estudio global, en el que se registrara el comportamiento de la GM-1 creciendo en diferentes medios, la producción final en peso seco de los extractos y la actividad de estas recuperaciones en larvas de primer estadio de S. frugiperda; llevando para cada proceso, un registro cuidadoso de las condiciones de laboratorio y un control adecuado de las mismas. Además, durante la fase de fermentación, el estudio se sujetó a las necesidades de investigación de la misma Facultad de Biología.

Los objetivos del trabajo fueron: evaluar medios de fermentación para la cepa GM-1, compuestos únicamente con materias primas o subproductos de origen vegetal; determinar la variación de rendimientos en los medios, al modificar la fuente y/o la concentración de la fuente de carbono; evaluar la actividad de las recuperaciones contra S. frugiperda, en términos de mortalidad larval o peso de larvas sobrevivientes; determinar la poten

cia de una formulación con el o los extractos más activos; y por último, establecer si existe variación en susceptibilidad de S. frugiperda.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades sobre el control microbiológico de insectos.

2.1.1. Orígenes.

Escribir sobre control microbiológico de insectos* es referirse, en realidad, a un aspecto aplicado de la patología de invertebrados. Esta ciencia, sin embargo, es demasiado joven pues se instituye formalmente durante la década de 1950, tras el denodado esfuerzo de Steinhaus (1945; 1949) por organizar y justificar el conocimiento desperdigado en diversas publicaciones, originadas durante el lapso de 1880 a 1940 por los primeros investigadores avocados a las enfermedades de insectos, entre ellos d'Herelle, Dutky, Forbes, Glaser, Masera, Metalnikov, Metchnikoff, Paillet, Walsh y White, entre los principales. Este grupo de científicos fue influido indudablemente por la teoría microbiana de la enfermedad, demostrada por Koch en 1876, la cual proporcionó las herramientas experimentales para probar el carácter infeccioso de los padecimientos en los organismos superiores; así como por los estudios de la pébrina y la flacheria del gusano de seda, realizados por Pasteur durante 1870 (Carpenter, 1979 y Glaser, 1925).

El control microbial, de acuerdo con Sweetman (1963) y Steinhaus (1949; 1968), tiene también sus orígenes en el siglo pasado; las ideas de Bassi en 1835 sobre el uso potencial de los patógenos de insectos benéficos para controlar plagas, fueron puestas en práctica con algún éxito por Metchnikoff en 1880 y Krassiltschik en 1888, quienes produjeron masiva-

* En lo sucesivo será referido como Control Microbial.

mente el hongo Metarrhizium anisopliae (Metch.) y lo diseminaron en las poblaciones naturales de Anisoplia austriaca (Herbst.). D'Herelle inició en 1911 el control microbial con bacterias; aisló de langostas enfermas un bacilo Gram-negativo, al cual llamó Coccobacillus acridiorum, conocido ahora como Cloaca cloacae var. acridiorum (d'Herelle), del cual reportó haber sido eficiente para originar epizootias en las poblaciones del mismo insecto. No obstante, sus observaciones no han sido confirmadas en investigaciones posteriores (Bucher, 1960; citado por Lysenko y Kucera, 1971). En Francia, durante los años de 1930, apareció una formulación comercial recomendada como insecticida, a base de esporas de una bacteria reportada por Mattés en 1927 como altamente patogénica. Este bacilo es considerado en nuestros días como el reasistamiento de la cepa descubierta por Berliner en 1911, a la que nombró Bacillus thuringiensis (Heimpel y Angus, 1963 y Hall, 1963).

A pesar de los avances anteriores, los trabajos realizados por Dutky y White, en su mayor parte de 1940 a 1950, son, a juzgar por muchos autores, el primer programa en forma de control microbial. El éxito que obtuvieron en la reproducción de Bacillus popilliae Dutky, el agente causal de la enfermedad lechosa del tipo "A" del escarabajo japonés, Popillia japonica Newm., y la introducción en las poblaciones naturales del mismo, así como de Amphimallon majalis (Raz.), fue un considerable incentivo para el estudio de los entomopatógenos (White y Dutky, 1940; Hall, 1963; Steinhaus, 1945; 1949; 1968 y Sweetman, 1963). Steinhaus (1951) y McConnell & Cutkomp (1954) revivieron el interés en B. thuringiensis, aunque todavía se le consideraba como un agente esencialmente infeccioso. En 1953 los postulados de Hannay sobre la inclusión parasporal modificaron el panorama hasta una teoría toxicológica; en breve, Angus presentó

en 1954 y 1956 evidencias experimentales sobre la participación de los cristales en la patogénesis del gusano de seda. Posteriormente, Steinhaus realizó un importante estudio relacionado con la potencialidad de la bacteria como entomopatógeno y su inocuidad en vegetales y mamíferos, que influyó positivamente en la autorización de los primeros insecticidas biológicos, en los Estados Unidos de América en 1958 (Hannay, 1953; Heimpel y Angus, 1963; Steinhaus, 1957 y Jacobs & Gerstein, 1960).

A pesar de todo, los resultados de las primeras formulaciones fueron irregulares, aún con el uso de los métodos de estandarización desarrollados por Burgerjon y Yamvrias (1959), Burgerjon (1962), Fisher (1963), Burges (1964) y Krieg (1965). Fue el descubrimiento de la cepa HD-1 por Dulmage en 1967, la que, siendo hasta doscientas veces más potente que sus antecesoras, vino a cristalizar muchos esfuerzos en el control microbial. La HD-1, que corresponde a una línea de la variedad kurstaki, es actualmente el principio activo de la mayoría de los productos comerciales y tiene su principal uso en los cultivos hortícolas (Dulmage 1970 y Dulmage & Aizawa, 1982).

2.1.2. En qué consiste el control microbial.

En su mayor parte, la investigación sobre entomopatógenos se ha concentrado en la búsqueda y selección de organismos, cuyas propiedades permitan su desarrollo hasta productos, con las mismas características de uso que un insecticida químico; utilizando ampliamente lo que se ha dado en llamar la tecnología de la aspersión (Hall, 1963 e Ignoffo y Anderson 1979). Sin embargo, el control microbial comprende, en su amplio sentido, el uso de entomopatógenos para contrarrestar poblaciones de insectos per-

judiciales, empleando esos agentes de control de acuerdo con sus atributos específicos; como insecticidas microbiales, aquellos incapaces de dispersarse y persistir en la naturaleza; y como introducciones, los que con un reducido inóculo pueden diseminarse y perdurar infectando con cierta periodicidad y eficiencia sus poblaciones hospederas. Heimpel, citado por Coppel y Mertins (1977), propuso en 1965 algunas características que deben cumplir los agentes de control microbial; sus principios se incluyen en la tabla I tomada de Burges y Hussey (1971), quienes consideraron además aspectos económicos.

Tabla I. Atributos deseables para entomopatógenos utilizados en el control microbial.

Concepto	Método de aplicación del agente
Rápida dispersión.	Introducciones.
Capacidad de dispersión.	
Persistencia.	
Inocuidad y estética en resultados.	
Control a niveles subeconómicos.	
Control predecible.	
Virulencia (acción rápida que evite daños inmediatos).	Insecticidas microbiales.
Facilidad de producción.	
Bajo costo.	
Que se conserve viable y virulento durante su almacenamiento.	
Facilidad de aplicación.	

2.1.3. Posibilidades del control microbial en el futuro.

Los recientes adelantos en el control microbial constituyen, indudablemente, la base de sus posibilidades de éxito en los próximos años. Además, como los principales logros dentro de este medio de combate de insectos están circunscritos, virtualmente, al desarrollo de bioinsecticidas*, una apreciación prácticamente completa de sus avances se puede obtener de la tabla II**; y, aunque Baker & Cook (1974) y Corke & Rishbeth (1981) revisaron los adelantos en el uso de microorganismos para el control de fitopatógenos, sólo se analizan en este caso las ramas de control microbial relacionadas con el combate de insectos, i.e. formulaciones microbiológicas, introducciones y abosimbiosis. Esta última, considerada por Burges y Hussey (1971), revisada por Krieg (1971) e inexplicablemente abandonada por Burges (1981).

Por otra parte, en opinión de reconocidas autoridades en control microbial como Burges, Dulmage, Hussey e Ignoffo, es la satisfacción de las necesidades de investigación, en los distintos campos de este método de combate de plagas, el factor central que determinará su potencial en el futuro. De acuerdo con este criterio, se ofrece a continuación un resumen que agrupa sistemáticamente, las necesidades u objetivos de estudio de cada rama del control microbial; anteponiéndoles una literal, asignada previamente a las ramas, y un dígito que representa su frecuencia en cada una.

Síntesis de las necesidades de investigación dentro del control microbial:

* Supra. pág. 3, punto 2.1.2. pass.

** Infra. pág. 9.

Ramas del Control microbial

A. Insecticidas microbiales

B. Introducciones.

C. Aposimbiosis.

A.1. Resolver para Bacillus thuringiensis las siguientes incógnitas:

Establecer la estructura química de los cristales y de la δ -endotoxina.

Estudiar la posibilidad de síntesis de la δ -endotoxina.

Conocer exactamente la relación entre la espora y la δ -endotoxina.

Determinar el valor de la selección de líneas e inducción de mutaciones en los rendimientos de δ -endotoxinas (Dulmage, 1979).

A.2: Desarrollar los sistemas de estandarización en virus, hongos y protozoarios (Ignoffo & Anderson, - 1979).

B.1. - A.3. Determinar la actividad en el campo de los insecticidas microbiales y entomopatógenos (Beegle, - et al., 1982).

A.4. Elevar la eficiencia y efectividad de las aplicaciones de insecticidas microbiales, desarrollando la tecnología y equipo de aplicación adecuados - (Couch, 1978).

- C.1. - B.2. - A.5. Integración de equipos multidisciplinarios, para darle un sólido impulso a la patología de insectos (Dulmage, 1979 y Dulmage, et al., 1981).
- C.2. - B.3. - A.6. Manipulación genética de entomopatógenos y simbioses, para el mejoramiento de cepas (Aizawa, 1971; Dulmage, 1979 y Martín & Dean, 1981).
- C.3. - B.4. - A.7. El continuo descubrimiento de otras especies y líneas que puedan ser preservadas como un banco de material disponible (Aizawa, 1971).
- B.5. Continuar la exploración de entomopatógenos factibles de introducción (Ignóffo y Anderson, 1979).
- C.4. Reanudar los estudios sobre la utilidad práctica de la eliminación de microsimbiontes en insectos, por medio de desinfecciones de los medios de transmisión o por quimioterapia (Krieg, 1971).

2.1.4. Limitaciones del control microbial.

En cierta forma, de las consideraciones del punto anterior se -- pueden desprender algunas limitantes eventuales del control microbial; no obstante, es conveniente tomar en cuenta las desventajas que han -- señalado algunos autores; entre ellas, las más importantes son: a) la variación común a todos los métodos de control; que inducida por factores como el espectro de susceptibilidad de los insectos, las condiciones ambientales y la distribución de los materiales, produce en el control microbial mayor efecto negativo, b) la naturaleza biológica -- de los agentes de control, como las relaciones con sus hospederos o --

la producción de toxinas. Estas características determinan que en las preparaciones insecticidas, la estandarización de su actividad sea, - más que necesaria, imprescindible, para que las predicciones de éxito en las formulaciones comerciales a nivel de campo sean más confiables y c) la economía de producción de entomopatógenos; es un factor que - puede convertirse en limitante, pues por lo regular su aplicación como insecticidas microbiales, requiere de grandes cantidades de material activo. E independientemente de su forma de aplicación, la producción de un entomopatógeno será o no factible, dependiendo de sus - características nutricionales; si puede crecer in vitro, es factible su reproducción utilizando la tecnología de fermentación, desarrollada para la industria de los antibióticos, de lo contrario la producción in vivo presenta mayor dificultad. Además, a ambos procesos son comunes las necesidades de preservación de formulaciones y/o ceparios, bajo condiciones que favorezcan su viabilidad y potencia, impidiendo la acción de factores como la luz ultravioleta, las altas temperaturas y la presión, a los cuales con frecuencia son susceptibles los - microorganismos. Afortunadamente, muchos nuevos métodos para la preservación de esos agentes, se han desarrollado recientemente (Aizawa, 1971; Burges y Hussey, 1971; Hall, 1963 e Ignoffo y Anderson, 1979).

2.1.5. Agentes de control microbial.

En la tabla II se mencionan los microorganismos que representan a los agentes de control más importantes; no se consideran las rickettsias ni los nemátodos, por las siguientes razones: las rickettsias - no han sido usadas nunca como agentes de control microbial, debido -

Tabla 11.- Preparaciones experimentales o comerciales de insecticidas microbiales.^a

Agente Microbial	Nombre Científico Tipo y Hospedero ^b	Producto Comercial	Productor
BACTERIAS			
	<u>Bacillus</u> <u>monitai</u>	Rabirusu	Sumitomo (Japón)
	<u>Bacillus</u> <u>popilliae</u>	Doom, Japidemic	Fairfax Biological Labs. (E.U.A.)
	<u>Bacillus</u> <u>thuringiensis</u>		
	β -Exotoxina ^c	Biotoxsymbacillin	All. Union Inst. Agr. Microbiol (U.R.S.S.)
	δ -Endotoxina ^d	Agritol	Merck & Co. (E.U.A.)
		Bactospeine	Roger Bellon (Francia)
		Bathurin	Chemapol-Biobrama (Checoslovaquia)
		Biospor	Farbwerke Hoechst (Alemania)
		Dendrobacillin	Glavmikrobiorpom (U.R.S.S.)
VIRUS			
	<i>Polihedrosis citoplasmica</i>		
	<u>Dendrolimus</u>	Matsukemin	Chugai Pharmaceutical Co. Ltd. (Japón)

(Continuación)

Polihedrosis nuclear

<u>Heliothis</u> ^e	Biotrol VHZ	Nutrilite Prod. (E.U.A.)
<u>Lymantria</u>	Virin-ENSH	Glavmikrobioprom (U.R.S.S.)
<u>Mamestra</u>	Virin-EX	Glavmikrobioprom (U.R.S.S.)
<u>Neodiprion</u>	Polyniocide	Indiana Farm Bureau (E.U.A.)
<u>Orygia</u>	TM Biocontrol-1	Forest Service (E.U.A.)
<u>Pieris</u>	Virin GKB	Latvian Agr. Acad. (U.R.S.S.)
<u>Prodenia</u> ^b	Biotrol VPO	Nutrilite Prod. (E.U.A.)
<u>Spodoptera</u>	Viron/S	Int. Minerals & Chem. Corp. (E.U.A.)
<u>Trichoplusia</u> ^g	Biotrol VTN	Nutrilite Prod. (E.U.A.)
<u>Aschersonia aleyrodii</u>	Aseronija	All Union Inst. Agr. Microbiol (U.R.S.S.)
<u>Beauveria bassiana</u>	Biotrol FBB	Nutrilite Prod. (E.U.A.)
	Boverin	Glavmikrobioprom (U.R.S.S.)
<u>Hirsutiella thompsonii</u>	ABG-6065	Abbott Labs. (E.U.A.)
<u>Metarrhizium anisopliae</u>	Biotrol FMA	Nutrilite Products (E.U.A.)

HONGOS^h

(Continuación)

PROTOZOARIOS^c

Nosema locustae

Mattesia trogodermiae

Nosema algerae

Vairimorpha necatrix

Nosema (=Perezia) pyrausta

^aFuente: Ignoffo & Anderson, 1979.

^bPara los virus.

^cExisten otros dos productos a base de δ -exotoxina de origen ruso: Eksotoksin y Toxobakterin.

^dExisten ocho productos más a base de δ -endotoxina fabricados por diversas compañías en el mundo: Baktharine, Biotrol, BTB, Dipel, Parasporin y Turicide (E.U.A.); Entobacterin e Insektin (U.R.S.S.) y Sporeine (Francia).

^eExisten tres productos más: Elcab, Virex y Viron/H (E.U.A.).

^fOtro producto más a base de este virus es el Viron/P (E.U.A.).

^gEl Viron/T (E.U.A.) es otro bioinsecticida a base del virus Trichoplusia.

^hNingún hongo es comercializado en el presente como insecticida microbial, pero varios fueron producidos y usados en gran escala en la Unión Soviética. (Ignoffo & Anderson, 1979.)

ⁱLos protozoarios no han sido nunca producidos industrialmente o vendidos como insecticidas microbiales.

principalmente a que muestran una marcada inespecificidad, afectando a vertebrados, y a que su naturaleza de patógenos obligados dificulta -- las operaciones de producción comercial, mientras que los nemátodos -- no son propiamente microorganismos, aunque sí han sido ya comercializa-- dos y tienen sus principales representantes en Romanomerms culicivo-- rax (Ross & Smith) como parásitos de mosquitos y Deladenus siricidico-- la contra una plaga forestal del género Sirex (Finney, 1981).

2.1.6. El control microbial en México.

Las publicaciones en español, relacionadas con estudios de con-- trol microbial en México, son en realidad muy escasas; es difícil cono-- cer su número y particularmente cuál es su tema. Por consiguiente, no existe mucha claridad con respecto al inicio de este medio de combate-- en nuestro país; se sabe, de acuerdo con Steinhaus (1949) por ejemplo, que d'Herelle realizó algunos estudios sobre una bacteria, que se en-- contraba infectando poblaciones naturales de Schistocerca spp. en Yuca-- tán durante 1911, sin embargo no hay antecedentes accesibles sobre es-- ta actividad en México y sólo, si acaso, pueden conseguirse las publi-- caciones en francés de este investigador.

Un lapso superior a los sesenta años, transcurrió desde entonces - para que se registraran algunos esbozos en control microbial. Una for-- mulación comercial de B. thuringiensis HD-1 var. kurstaki, fue utiliza-- da en pequeña escala en Chiapas durante 1974 a 1976. Asperjando árbo-- les de sombra del café, conocidos como "chalamus" o "ingas", para com-- batir un complejo de especies lepidópteras de la familia Notodontidae,

en su mayoría del género *Hemicera* y en menor proporción algunos satúrnidos, citharónidos y megalopígididos, se pudo observar una alta eficiencia en la actividad de las aplicaciones (Dr. Tejada*, comunicación personal); este es probablemente el primer antecedente en forma, sobre el uso del control microbial en México.

Ramos (1976) separó tres extractos de cultivos de *M. anisopliae*, que produjeron mortalidades de hasta 100% en larvas de tercer estadio de *Heliothis virescens* (Fabricius), durante las primeras cuatro horas después de su ingestión. Cuando las larvas sobrevivían a este tiempo, sin embargo, la mortalidad disminuía considerablemente e incluso dejaba de producirse; como esta investigadora no especifica el uso de una dosificación, lo anterior pudo deberse probablemente al suministro de cantidades subletales. Por otra parte, las conidias del hongo producen reacciones de hipersensibilidad de diversos grados en humanos y en estudios posteriores se ha encontrado que las supuestas toxinas, presentes en recuperaciones obtenidas con la misma metodología, muestran una alta inespecificidad, incluyendo en su espectro a mamíferos (Tejada*, comunicación personal).

Cisneros (1980) y Flores (1981) estudiaron en el campo, la actividad de formulaciones comerciales de *B. thuringiensis* contra *Heliothis zea* (Boddie) y *Pieris rapae* (L.); los resultados del primero fueron -

*Investigador entomólogo y catedrático de tiempo completo del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, División de - - Ciencias Agropecuarias y Marítimas.

irregulares y la baja incidencia en la segunda plaga impidió una evaluación confiable, aunque la inclusión de observaciones en poblaciones de Trichoplusia ni (Hubner) no superaron al testigo. Por otra parte, Cuevas (1975), en su "evaluación de la acción entomófaga de agentes microbianos en Heliothis virescens", reporta el parasitismo de dípteros e himenópteros, más no la incidencia de hongos o bacterias patógenas.

Varios investigadores de la Dirección General de Sanidad Vegetal, en coordinación con el Instituto Pasteur de Francia y el Instituto Politécnico de la ciudad de México, han estudiado desde 1976 algunos hongos parasíticos en poblaciones naturales de la "mosca pinta de los - - pastos", en la región del Papaloapan en Veracruz. Ayala (1982)* realizó un resumen de estas investigaciones, que comprende de 1976 a 1980 y en el que se incluyen algunos estudios importantes; Toriello y Hernández (1982)* efectuaron investigaciones sobre la biología e inocuidad de dos Entomophthorales, Erynia neoaphidis y Conidiobulus major, encontrando factible su producción en masa y una toxicidad casi imperceptible a mamíferos, aunque los primeros ensayos a nivel de campo en poblaciones de la mosca no arrojaron resultados positivos.

Galán y colaboradores* reportaron los aislamientos de 13 cepas de B. thuringiensis, obtenidas de muestras de suelo de distintas regiones de la república. Núñez (1980) y Castro (1982) trabajando con la GM-1, uno de los aislamientos anteriores, encontraron 100 y 44% de mortali-

*Mesa redonda de Control Microbial, I.T.E.S.M., Monterrey, N. L., Febrero de 1982.

dad en larvas de primer estadio de S. frugiperda, respectivamente. - Mientras Maldonado (1981) con los mismos organismos obtuvo una potencia de 10,900 U.I. Arroyo (1982), Castro (1982) y Murga (1983), al trabajar con la GM-2, encontraron mortalidades que variaron de 4 a 32% - contra T. ni y H. virescens. Recientemente se han aislado otras cepas y en la actualidad son diecinueve, de las cuales se pueden obtener antecedentes en el Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. (Galán*, comunicación personal).

Todos los reportes anteriores, en lo que se refiere a la actividad entomopatogénica, con excepción de las experiencias del Dr. Tejada, Cisneros (1980) y Flores (1981), son esencialmente resultados de laboratorio; no obstante se puede decir, con reducido error, que es lo que ha ocurrido con el control microbial en México, pues si se considera el aspecto práctico, el avance es similar o, a decir verdad, proporcionalmente inferior. La Dirección General de Sanidad Vegetal, en su manual de plaguicidas para 1982, autoriza el uso de formulaciones comerciales a base de B. thuringiensis, para el control de algunos lepidópteros importantes en diversos cultivos (Tabla III); los antecedentes de sus resultados, sin embargo, no se conocen con certidumbre.

Es claro entonces, que el control microbial en México está lejos todavía, de una activa participación en los programas de control integrado que, por su carácter ecológico, se les ha mostrado buen interés por las autoridades de agricultura. Una buena medida para impulsar la

*Jefe de Laboratorio de Microbiología Industrial y Suelo; F.C.B., - - U.A.N.L.

Tabla III. Plagas agrícolas para las cuales la Dirección General de Sanidad Vegetal autoriza el uso de formulaciones comerciales, a base de los principios activos de Bacillus thuringiensis Berliner.

Nombre científico del insecto.	Cultivos.
<u>Trichoplusia ni</u>	Brócoli, calabacita, col, coliflor, jitomate, lechuga, melón, pepino, sandía; algodón, cártamo, soya y tabaco.
<u>Pieris rapae</u>	
<u>Pieris protodice</u>	Col y coliflor.
<u>Leptophobia aripa</u>	
<u>Plutella xylostella</u>	Col.
<u>Manduca sexta</u>	
<u>M. quinquemaculata</u>	Jitomate.
<u>Spodoptera exigua</u>	Lechuga.
<u>Pseudoplusia includens</u>	
<u>Heliothis zea</u>	Soya.
<u>Colias eurytheme</u>	Alfalfa.
<u>Heliothis virescens</u>	Tabaco.

investigación, no sólo en la patología de insectos y control microbial, sino en cualquier otro campo de estudio, es el desarrollo de proyectos de investigación y la formación de especialistas; considerando, desde luego, la realidad que vive el país y discernir sus prioridades substanciales tecnológicas y socioeconómicas. La intención indagatoria - por ella misma, dispersa y sin una planificación global y congruente, no logrará desarrollar la infraestructura adecuada para el avance científico y tecnológico que se requiere, por el contrario todo esfuerzo a lo sumo, mientras se siga haciendo de esta manera, se perderá inmerso en la compleja problemática de la planeación nacional, que influye - - inexorablemente en la estructura y actividad científica.

2.2. Bacillus thuringiensis Berliner y control microbial.

2.2.1. Descubrimiento.

Ishiwata aisló en 1901 a B. thuringiensis de larvas enfermas de Bombyx mori (L.); ésto es lo que, con toda propiedad, afirman muchos autores, gracias al trabajo que Aoki y Chigasaki publicaron en 1915 y en el cual realizaron una detallada descripción del aislamiento de - - Ishiwata, para el que propusieron el nombre de Bacillus sotto (Ish.). De algún valor fueron, sin embargo, las observaciones hechas ya por el propio Ishiwata durante 1905 y 1906, acerca de que la actividad patogénica parecía exclusiva de los cultivos viejos bien esporulados (Aoki y Chigasaki, 1915). Lo mismo no puede ser dicho del estudio sobre Bacillus bombycis (Auctt.), realizado por Pasteur durante los años de 1870, aunque existe la duda de si se trataba o no de una bacteria cristalífera

ra, pues en ambos casos se indagaron las causas de la flachería del mismo insecto (Glaser, 1925; Steinhaus, 1945; 1949 y Norris, et al., 1981). Berliner aisló en 1911 un bacilo esporulado de larvas enfermas de Anagasta (=Ephestia) kuehniella (Zell.), al cual identificó en 1915 como una nueva especie y dió el nombre de B. thuringiensis, que hoy se reconoce como especie tipo.

La similitud entre los aislamientos de Ishiwata y Berliner fue advertida por Toumanoff y Vago, quienes separaron del gusano de seda, B. mori, una bacteria formadora de esporas, relacionándola taxonómicamente con las obtenidas por aquellos investigadores y denominándola como una variedad de Bacillus cereus (Frank. y Frank.), de tal forma que, de acuerdo con los científicos franceses, el aislamiento de Ishiwata debiera ser B. cereus var. sotto, el obtenido por Berliner var. thuringiensis y el de Ellos var. alesti (Toumanoff y Vago, 1951 y Toumanoff & LeCorrolier, 1959). Esta proposición fue más tarde objeto de extensas discusiones para establecer el nombre específico oficial, cf., Heimpel y Angus (1963) y Lysenko (1963). Independientemente de las divergencias de opinión con respecto a este punto, pues afortunadamente no ha sido una condición siné qua non para el desarrollo de este entomopatógeno, se reconocen en el presente, treinta variedades clasificadas dentro de la especie ampliamente aceptada de B. thuringiensis, propuesta por Heimpel y Angus en 1958 como la especie principal; un registro de sus aislamientos se proporciona en la tabla IV (Heimpel y Angus 1963 y U.S.D.A., 1982).

Tabla IV. Descubrimientos de las variedades de Bacillus thuringiensis Berliner.^a

<u>Variedades</u>	<u>Serovar^b</u>	<u>Descubridor</u>	<u>Año</u>	<u>Fuente</u>	<u>Localización</u>
<u>sotto</u>	4a 4b, sot	Ishiwata	1901	<u>Bombyx mori</u>	Japón
<u>thuringiensis</u>	1, thu	Berliner	1911	<u>Anagasta kuehniella</u>	Alemania
<u>subtoxicus</u>	6, sub	Steinhaus	1945	<u>Plodia interpunctella</u>	E.U.A.
<u>entomocidus</u>	6, ent	Steinhaus	1950	<u>Aphomia gularis</u>	E.U.A.
<u>alesti</u>	3a, ale	Toumano ^{ff} & Vago	1951	<u>Bombyx mori</u>	Francia
<u>dendrolimus</u>	4a 4b, den	Talalaev	1956	<u>Dendrolimus sibiricus</u>	U. R. S. S.
<u>finitimus</u>	2, fin	McNamea	1956	<u>Malocosoma disstrata</u>	Canadá
<u>galleriae</u>	5a 5b, gal	Isakova	1956	<u>Galleria mellonella</u>	U. R. S. S.
<u>toumano^{ff}i</u>	11a 11b, tou	Toumano ^{ff}	1956	<u>Galleria mellonella</u>	Francia
<u>aizawai</u>	7, aiz	Aizawa	1961	<u>Granja sericicola</u>	Japón
<u>darmstadiensis</u>	10, dar	Krieg	1961	<u>Galleria mellonella</u>	Alemania
<u>kenyae</u>	4a 4c, ken	Norris & Burges	1961	<u>Ephesia cautella</u>	Inglaterra
<u>kurstaki</u>	3a 3b, kur	Kurstak	1962	<u>Anagasta kuehniella</u>	Francia
<u>morisoni</u>	8a 8b, mor	Norris	1963	<u>Anagasta</u> sp.	Escocia

(Continuación)

<u>tolworthi</u>	9, tol	Norris	1963	<u>Plodia sp.</u>	Inglaterra
<u>thompsoni</u>	12, tho	Thompson	1969	<u>Galleria mellonella</u>	E.U.A.
<u>canadensis</u>	5a 5c, can	Morris	1972	<u>Acrionicta grisea</u>	Canadá
<u>ostrinae</u>	8a 8c, ost	Ren <u>et al.</u>	1975	<u>Ostrinia nubilalis</u>	China
<u>pakistanii</u>	13, pak	Shaikh	1975	<u>Laspeyresia pomonella</u>	Pakistán
<u>wuhanensis</u>	(c)	Hubel Institute	1976	<u>Anomis flava</u>	China
<u>israelensis</u>	14, isr	Goldberg & Margalit	1977	Criadero de mosquitos	Israel
<u>dakota</u>	16, dak	DeLuca & Larson	1978	Suelo	E.U.A.
<u>indiana</u>	15, ind	DeLuca & Larson	1978	Suelo	E.U.A.
<u>kyushuensis</u>	11a 11c, kyū	Ohba & Aizawa	1979	Granja Sericícola	Japón
<u>tohokuensis</u>	17, toh	Ohba & Aizawa	1981	Granja Sericícola	Japón
<u>humano-toensis</u>	18, hum	Ohba, <u>et al.</u>	1981	Granja Sericícola	Japón
<u>tochigiensis</u>	19, toc	Ohba, <u>et al.</u>	1981	Granja Sericícola	Japón
<u>colmeri</u>	20, col	DeLuca ^d	1982	Polvo de granos ^d	E.U.A.

^aFuentes: Dulmage y Aizawa (1982); Ohba y Aizawa (1981); Ohba et al. (1981) y U.S. Department of Agriculture (1981).

^bDe acuerdo con la nomenclatura propuesta por de Barjac (1981).

(c) Wuhanensis no tiene flagelos por lo que no ha sido serotipificada.

^dComunicación personal, Dr. H.T. Dulmage. ARS, SR, Subtropical Texas Area, Cotton Insect Unit, Brownsville, Tx. 78520, U.S.A.

2.2.2. Identificación.

2.2.2.1. Consideraciones generales sobre la denominación de B. thuringiensis.- Si Heimpel y Angus encontraban, en 1963 el nombre de Bacillus thuringiensis muy arraigado en la literatura, en nuestros días las publicaciones relacionadas con esta especie son incalculables. Sin embargo, todavía con alguna frecuencia, su decisión de considerar a este bacilo como una especie independiente de B. cereus, tomando como característica distintiva su producción de cristales y su patogenicidad a insectos, es puesta en tela de juicio por varios autores - - - (Krieg, 1981 y Buchanan & Gibbons, 1974).

Tratar de aclarar si tal decisión fue o no acertada, está fuera de los propósitos de este escrito, además de la falta de potestad sobre el tema; por otro lado, sería fútil enunciar simplemente las propiedades y características conocidas de la especie, pues equivaldría a la cómoda tarea de transcribir información ut supra sin analizarla con sentido crítico. Mención aparte merece la cuestión acerca de la utilidad de hacer tal aclaración, pues aunque el Manual de bacteriología determinativa de Bergey, la máxima autoridad taxonómica en América, objeto en su octava edición a B. thuringiensis como especie, la serotipificación es retenida como método suplementario de clasificación y se han hecho sugerencias para que se les conceda el rango de variedad - - (Buchanan y Gibbons, 1974 y de Barjac, 1981). Es obvio entonces, que tales decisiones conciernen a taxónomos; empero dependen de un conocimiento claro del objeto y por ello es importante el análisis de los criterios adoptados por los científicos involucrados.

La disención se originó en el sentido de si B. thuringiensis, reúne características específicas suficientes para ser considerado como tal o es tan sólo una variedad de B. cereus. De esta última opinión, la cual rara vez es apoyada en nuestros días, fueron los estudios de Smith, Gordon y Clarke (1946), Toumanoff y Vago (1951), Toumanoff y LeCorroller (1959), Lysenko (1963), Lysenko y Kucera (1971) e incluso Krieg (1981). Este grupo de investigadores fundamentó sus razonamientos, en el hecho de que las propiedades culturales y bioquímicas, así como algunas respuestas de sensibilidad, son paralelas en cepas de B. cereus y B. thuringiensis y que las características cristalíferas y de patogenicidad a insectos, no bastaban para su distinción. La tabla V, incluida por Krieg (1981), pone de manifiesto la similitud entre esas bacterias; también, Krieg indicó las dificultades para obtener una diferenciación convincente de las mismas, entre las que destaca la incidencia de mutantes acristalíferos, la ocurrencia de tipos no entomopatogénicos cristalíferos, la ocurrencia de autoaglutinantes y no aglutinantes que impiden la clasificación basada en los antígenos H y el paralelismo entre serotipos H de líneas cristalíferas y no cristalíferas.

Estas últimas observaciones, han sido corroboradas recientemente por varios investigadores, entre ellos: Ohba y Aizawa (1978), quienes aislaron bacilos acristalíferos que reaccionaron en un 13.8% de los casos, con antisuero H de B. thuringiensis e incluso, notaron que estas formas acristalíferas H aglutinantes se encontraron distribuidas en el ambiente, con mayor frecuencia que las formadoras de esporas cristalíferas. Perlak, Mendelshon y Thorne (1979), aislaron del suelo un fago,

Tabla V. Características diferenciales del grupo de especies correspondientes a la subdivisión IA del género Bacillus.¹

Caracter (es)	<u>Bacillus cereus</u>	<u>Bacillus thuringiensis</u>	<u>Bacillus finitimus</u>	<u>Bacillus anthracis</u>	<u>Bacillus megaterium</u>
Cuerpo parasporal	-	+	+	-	-
Flagelos	+	+	+	-	d
Cápsula	-	-	-	+ ²	+ ³
Producción de Acetoina	+	+	+	+	-
Acido a partir de manitol	-	-	-	-	+
Amilasa	+	+	-	+	+
Proteinasa	+	+	+	+	d
Hemilisina	+	+	+	-	-
Fosfolipasa	+	+	+	+	-
Crecimiento anaeróbico en agar	+	+	+	+	-
Sensibilidad a γ -fagia	-	-	-	+	-
Sensibilidad a Lisonzima	-	-	-	-	+
Sensibilidad a Penicilina G	-	-	-	+	-

¹Fuente: Krieg, 1981.

- Negativo en caracter/reacción.

d Reacciones diferenciales.

+ Positivo en caracter/reacción.

²Producido en agar-bicarbonato bajo CO₂.

³Producido en agar glucosa.

TP-13, inductor de la formación de esporas y cristales en el bacilo y - aunque no determinaron los mecanismos de conversión, presentaron pruebas de su transducción hasta un ritmo de 10^{-6} y 10^{-5} . Cuando esto sucede, es importante volver la atención años atrás; cuando Lysenko - - (1963), en su publicación sobre taxonomía de bacterias entomopatógenas, señala: "...una especie debe ser definida por un complejo y correlación de todas sus propiedades, de tal forma que no importa si un rasgo particular se pierde o es atípico...", método del cual reconoció su dificultad y costo en ese entonces, no obstante esto es lo recomendado por el manual de Bergey, desde sus primeras ediciones.

Jacobs y Gerstein (1960), Heimpel y Angus (1963), Norris y Burges (1965) y de Barjac (1981), representan la contraposición al criterio anterior; respaldada por una intensa actividad científica, en la cual se encuentran involucrados una gran cantidad de investigadores en el mundo, que reconocen a B. thuringiensis como una especie aparte. Los últimos cinco, particularmente, son autores de los métodos para la determinación de subespecies de este bacilo, los cuales consisten en las reacciones bioquímicas propuestas por Heimpel y Angus en 1958; las técnicas inmunológicas desarrolladas por Bonnefoi & de Barjac en 1963; de Barjac & Bonnefoi en 1962 y el análisis electroforético de esterasas - sugerido por Norris en 1964 (Dulmage, 1979 y de Barjac y Bonnefoi, - - 1973). En opinión de Heimpel y Angus (1963), la propiedad cristalífera y patogenicidad a insectos, constituyen características suficientes para considerar los bacilos formadores de cristal como una especie - - aparte de B. cereus y éste es el consenso que se sigue hasta el presente.

2.2.2.2. Posición taxonómica de Bacillus thuringiensis Berliner.- Con excepción del orden y suborden, obtenidos de Breed, Murray y Hitchens (1948), el siguiente taxón es el que aparece en la octava edición del manual de Bergey, de Buchanan y Gibbons (1974).

Reino	Procaryotae.
División II	Procariotes indiferentes a la luz.
Clase I	Bacterias. Partes 2-17.
Parte 15	Bacilos y cocos formadores de endosporas.
Orden I	Eubacteriales.
Suborden I	Eubacteriineae.
Familia I	Bacillaceae.
Género I	<u>Bacillus</u> (Cohn, 1872).
Especie	<u>thuringiensis</u> (Berliner, 1911).

2.2.2.3. Generalidades de la familia Bacillaceae.- De acuerdo con Buchanan y Gibbons (1974), existen cuatro características básicas que reúnen los miembros de la familia Bacillaceae, estas son: a) la capacidad de formar endosporas, b) el contenido de guanina y citosina (G+C) en la molécula de ADN, varía dentro de un rango de 32 a 62 moles % para Bacillus y de 23 a 43 para Clostridium, c) la presencia de ácido diaminopimélico en el peptidoglicógeno de la pared celular y d) la incidencia de formadores atípicos de endosporas. Otras características bacteriológicas se pueden agrupar de la siguiente forma:

i) Reacción de Gram. Positiva.

ii) Morfología. Células en forma de bastón; en un sólo género esféri

cas. No producen micelio; sus endosporas, a diferencia de las células vegetativas, son más refractivas, menos susceptibles a teñirse, más resistentes al calor y otros agentes destructivos y contienen 5 a 15% de peso seco de ácido dipicolínico. Presentan además una celda central o corazón, encerrada por una corteza de naturaleza peptidoglicogénica, - más una cubierta esporal externa conocida como exosporio. Pueden ser móviles, con flagelos laterales o peritricos, o no móviles.

iii) Fisiología. Aeróbicos, facultativos o anaeróbicos.

Aunque se reconocen ampliamente cinco géneros dentro de Bacillaceae, Norris, et al (1981) consideran uno más, el género Thermoactinomyces, propuesto por Cross y Unsworth ese mismo año; a continuación se describe una llave para los miembros de esta familia, obtenida de Buchanan y Gibbons (1974) y la publicación de Norris, et al (1981).

Claves para los géneros de la familia Bacillaceae:

I . Células en forma de bastón.

A. Aeróbicos o facultativos, normalmente productores de catalasa.

Género I Bacillus

B. Microaerofílicos, no productores de catalasa.

Género II Sporolactobacillus

C. Anaeróbicos.

1. No reductores de sulfato a sulfito.

Género III Clostridium

2. Reductores de sulfato a sulfito.

Género IV Desulfotomaculum

II . Células esféricas en paquetes.

Género V Sporosarcina

III. Células en forma de hifas.

Género VI Thermoactinomyces

2.2.2.4. Características del género Bacillus. - Con el mismo criterio - descriptivo utilizado para los rasgos de la familia, se agrupan a continuación las características generales de Bacillus:

i) Reacción de Gram. Positiva o sólo positiva en sus fases iniciales de crecimiento; o negativa.

ii) Morfología. Células vegetativas en forma de bastón, rectas o casi rectas con 0.3 a 2.2 μ de ancho y 1.2 a 7.0 μ de longitud. La mayoría móviles con flagelos peritricos, típicamente laterales. Una endospora por célula.

iii) Fisiología. Son organismos quimio-organotróficos; el metabolismo de sus células vegetativas es respiratorio, fermentativo o ambos, utilizando varios sustratos orgánicos. En el metabolismo respiratorio, - el electrón aceptor terminal es oxígeno molecular, aunque en algunas - especies es sustituido por nitrato; salvo algunas excepciones son productores de catalasa. Algunas líneas estudiadas, estrictamente aerobias o anaerobias facultativas, han arrojado resultados de G+C del ADN que van desde 32 hasta 62 moles %. La esporulación no es suprimida - por exposición al aire.

Breed, Murray y Smith, citados por Krieg (1981), presentaron en -

su séptima edición del manual de Bergey, una separación de Bacillus en dos divisiones; la I con veintidós especies y la II con veintiséis menos reconocidas. La división I, a su vez, es separada en subdivisiones IA y IB, cuyos principales representantes son B. cereus y B. subtilis, respectivamente. B. thuringiensis está comprendida en la división I y subdivisión IA, de las cuales se mencionan enseguida sus características genéricas (Krieg, 1981).

a) División I.

a.1. Células vegetativas Gram-positivas.

a.2. Morfología. Esporas de forma elipsoidal a cilíndrica, con una delgada pared esporal cubierta por dos capas: el endo y el exosporio. Las esporas tienen una posición central a terminal en un esporangio no siempre hinchado.

a.3. Fisiología. Son productores de ácido, pero no de gas, a partir de carbohidratos. Descomponen las proteínas originando amonía; son formadores de catalasa y crecen aeróbicamente en peptona-glucosa-agar.

b) Subdivisión IA.

b.1. Morfología. El diámetro de las células vegetativas es mayor de 0.9μ .

b.2. Fisiología. Las especies de la subdivisión IA comparten algunas características bioquímicas; la tabla V* muestra las reacciones de estas especies. También Przyborowski en 1964 y Yamanna & Jones en 1961, citados por Krieg (1981), demostraron una relación interespecífica para antígenos de las esporas de los miembros de este grupo.

* Supra, pág. 23.

2.2.2.5. *Características particulares de Bacillus thuringiensis Berliner.*- Sus células vegetativas son de 1.0 a 1.2 μ de ancho y 3 a 5 μ de longitud; la mayoría de las cepas son móviles en las fases iniciales de su crecimiento, con flagelos peritricos (Dulmage, 1979). Son productoras de un cuerpo parasporal, algunas veces dos, con un diámetro de Ca. 1 μ .

Parte de su fisiología está dada por las reacciones bioquímicas, que Buchanan y Gibbons (1974) propusieron para esta especie y que se indican en la tabla VI, en la que se añadieron las respuestas de la cepa GM-1 estudiada por Maldonado (1981).

2.2.2.6. *Características subespecíficas de Bacillus thuringiensis.*- La base de una diferenciación varietal o subespecífica, está dada por la ejecución e interpretación de tres pruebas fundamentales, estas son: a) reacciones bioquímicas, propuestas por Heimpel y Angus en 1958 y modificadas por Krieg en 1961 (Heimpel y Angus, 1963), b) serología flagelar, sugerida por de Barjac y Bonnefoi en 1962 (De Barjac y Bonnefoi, 1973) y c) electroforesis de esterasas, propuesta por Norris en 1964 (Norris y Burges, 1965).

De acuerdo con estos tres métodos, de Barjac (1981) publicó una llave determinativa en la cual describió quince serotipos y actualmente se reconocen veintiocho serovares, resultado de veinte serotipos distintos* identificados bajo el sistema de de Barjac (U.S. Dept. Agr.,

*Supra, pág. 19

Tabla VI. Pruebas bioquímicas descritas en el Manual de Bergey para *B. thuringiensis* y reacción de la cepa GM-1 a ellas.ⁱ

Reacción	Producto de la acción sobre glucosa.	<i>B. thuringiensis</i>	GM-1
	Acido	+	+
	Gas	-	-
	Acetolna	+	+
	Catalasa	+	+
	Hidrólisis del almidón	+	+
	Hidrólisis de la caseína	+	-*
	Crecimiento en agar-dextrosa-Saboraud con 7% de NaCl.	+	-*
	Acido de arabinosa, xilosa y manitol	-	-
	Reducción de NO_3^- a NO_2^-	+	+
	Alkali en agar sales de citrato	+	-*

ⁱFuente: Maldonado (1981).

*Resultado de una sola observación, no coincidentes.

1982). Por último, otras características que han sido propuestas son: el cristal tipo (Krywienczyk, 1977), bacteriofagia y distribución geográfica (Norris y Burges, 1965), rango de hospedero y producción de toxinas (Heimpel y Angus, 1963); de ellas, el cristal tipo es el más valioso y factible de estudio por su relatividad toxicológica, como se demuestra en el estudio de Krywienczyk, et al (1981), en el que la serología del cristal pudo detectar 2 tipos de cristal dentro de un mismo serotipo, y esto fue confirmado por una actividad insecticida diferencial.

2.2.2.7. B. thuringiensis GM-1.- Algunas características bacteriológicas de la cepa GM-1, fueron descritas por primera vez por Maldonado (1981). Se trata de un bacilo que forma una endospora ovoide en posición subterminal y un cristal bipiramidal con 0.6 μ de ancho y 1.6 μ de longitud. Las colonias, en agar nutritivo, tienden a ser circulares con bordes ondulados, color crema, sin pigmentos y de consistencia un tanto seca. Con respecto a sus características bioquímicas, Maldonado estudió las reacciones de esta cepa en once pruebas, sugeridas por de Barjac y Bonnefoi en 1973 para las variedades aizawai y kenyae y encontró bastante similitud con ambas, sobre todo esta última. Pruebas bioquímicas recientes revelaron nuevamente que la GM-1 reacciona igual que la var. kenyae, sin embargo, cuando se estudió su serología, se pudo determinar que correspondió al serotipo veinte de la var. colmeri (Barba* comunicación personal).

*Tesisista del Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, - F.C.B., U.A.N.L.

2.2.3. Naturaleza entomopatogénica.

2.2.3.1. Distribución, habitat y nicho ecológico.

Con excepción de la variedad aizawa obtenida por Aizawa en 1961, del polvo de una granja sericícola, todos los aislamientos hasta 1976, fueron reportados en larvas enfermas de lepidópteros y esto hizo suponer hasta entonces, que el habitat de B. thuringiensis estaba circunscrito a los sitios de reproducción de insectos, inducida o incidental, y que su nicho ecológico era esencialmente, el producir bacteremias a lepidópteros inmaduros. Por sitios de reproducción inducida, se comprenden los insectarios de granjas de la industria de la seda y laboratorios reproductores de larvas de plagas agrícolas; mientras que un centro de reproducción incidental, se considera al desarrollo de larvas almacenadas involuntariamente con los productos de cosecha.

Sin embargo la presencia del bacilo en estos lugares, no explicaba satisfactoriamente su nicho; pues aunque se puede señalar que cumplen en general, con el triángulo requerido para el desarrollo epizootiológico: hospedero susceptible, condiciones ambientales apropiadas y un inóculo virtualmente patógeno; son contados los reportes de la aparición de verdaderas epizootias, tales como aquellas observadas por -- Kurstak en 1962, Vago y Kurstak en 1965 y Burges en 1963 (Burges & Martouret, 1971 y Falcon, 1971). Por el contrario son más frecuentes las enzootias, como lo sugieren los reportes sobre incidencias bajas de B. thuringiensis afectando poblaciones de B. mori, P. gossypiella, Ephestia cautella (L.), Galleria mellonella (L.), A. kuehniella, Plutella maculipennis (Curtis), Plodia interpunctella (Hubner) y Pyralis farinalis L. (Dulmage & Aizawa, 1982).

A lo anterior es importante agregar que, aunque los estudios de Ohba y Aizawa (1978) y Ohba, Aizawa y Furusawa (1979), revelan una estrecha relación entre las áreas sericícolas y B. thuringiensis, éste rara vez se convierte en problema para la producción; lo mismo suele suceder con el desarrollo de insectos de los laboratorios de cría masiva, aún cuando se han criado especies tan susceptibles como Ephestialutella (Hubner), E. cautella y G. mellonella, suprimiéndose toda clase de medidas para impedir epizootias por B. thuringiensis, tales como las desinfecciones con formalina recomendada por Takasu, Aizawa y colaboradores (Dulmage y Aizawa, 1982) y a las cuales se atribuía toda la actividad anti-tirológica en B. mori; hipótesis que fue puesta en duda, cuando Aizawa (1971) demostró la independencia entre la presencia del bacilo y la incidencia de daño en su hospedero. Una explicación más aceptada ahora, sobre el carácter enzootico y eventual de B. thuringiensis, es la que se relaciona con su forma de transmisión; la necesidad de ser ingerido, en sus formas de spora y cristal, es precisamente la que hace a B. thuringiensis comportarse como un producto tóxico y naturalmente como un organismo ineficiente para diseminarse (Burges, 1973; citado por Dulmage y Aizawa, 1982). Por otra parte, a pesar de que de acuerdo con Burgerjon & Martouret (1971), y Dulmage & Aizawa (1982), B. thuringiensis casi nunca provoca epizootias en la naturaleza, estudios recientes han revelado que su distribución es quizá tan amplia como el habitat dado por Breed, Murray y Hitchens (1948), Jacobs y Gerstein (1960) y Krieg (1981), para los miembros del género. Ohba y Aizawa (1981) y Ohba et al (1981), en sus inspecciones de suelos de áreas sericícolas, descubrieron tres nuevos serotipos*; Delucca,

*Supra. pág. 20.

Simonson y Larson (1981), en dos años de exploraciones en suelos de agroecosistemas no tratados con B. thuringiensis, encontraron alguna proporción del bacilo; 16.8% de 95 suelos analizados y tan sólo 0.54% de 46,353 aislamientos. A pesar de que podría suponerse a priori, que esta bacteria constituye una cantidad insignificante del complejo microbial de los suelos, lo cierto es que se requiere indagar aún más en este habitat antes inexplorado.

Otras investigaciones importantes han sido las realizadas por Delucca, Palmgren y Ciegler (1982), quienes reportan incidencias de hasta 55% de B. thuringiensis, en muestras de polvo en tolvas y sinfines para granos y 30% en el polvo aéreo de los mismos sitios; así como el valioso aislamiento de Goldberg y Margalit en 1977, obtenido de una muestra del suelo de un criadero de mosquitos, identificado, bajo el sistema de de Barjac, como serovar 14, isr. Esta subespecie mostró una elevada toxicidad en Chironomus crassicaudatus Malloch., C. decorus Johansen, Aedes aegypti (L.) y Culex quinquefasciatus Say y en la actualidad es el principio activo de un producto comercial recomendado ampliamente para mosquitos (de Barjac, 1981 e Ignoffo, et al, 1981).

En resumen, los últimos descubrimientos demuestran, al menos parcialmente, que B. thuringiensis es un organismo mucho más ubicuo de lo que, todavía, se consideraba durante parte de la década de 1970; mientras que su nicho como patógeno de lepidópteros y de algunos coleópteros e himenópteros, es más propio reconocer la clasificación de Heimpel y Angus (1963) y Krieg (1981), quienes lo señalan como patógeno obligado o facultativo, este último con hospederos inespecíficos.

2.2.3.2. Rango de hospederos.

Trichoplusia ni (Hubner) ha sido por más de diez años, el ejemplo más conocido de control de una plaga en cultivos hortícolas con B. thuringiensis; otros lepidópteros combatidos con frecuencia son H. virescens, Manduca sexta (Johannsen), Pieris brassicae (L.) y P. rapae, lo mismo que algunas plagas forestales como Hyphantria cunea (Drury), - - Lymantria dispar (L.), Orgyia pseudotsugata (McDunnough) y Choristoneura fumiferana (Clemens). Estos son los casos más importantes, sobre la utilidad práctica de formulaciones comerciales a base de la delta-endotoxina y esporas de la cepa HD-1, serovar 3a3b kur, cristal tipo K-1 de esta bacteria (Dulmage y Aizawa, 1982); no obstante, Krieg - - (1981) reportó un total de treinta y cinco lepidópteros, que son controlados en países como Alemania, Estados Unidos, Francia y la Unión Soviética. A todo ello, sólo falta agregar el uso del serovar 14 isr, para el control de varias especies de mosquitos de los géneros Aedes, Anopheles y Culex, así como su probada toxicidad en otros dípteros de los géneros Chironomus, Diamessa y Simulium (Ignoffo, et al, 1981 y - Dulmage, et al, 1981).

Existe además una gran cantidad de reportes sobre la actividad de este bacilo, con la única particularidad de que, en su mayor proporción se trata de estudios realizados bajo condiciones de laboratorio, en los que en algunos casos pudiera estar involucrado otro principio tóxico, ajeno al complejo spora-cristal, v.gr.: la beta-exotoxina c-thuringiensin*. Así, por ejemplo, Burgerjon y Martouret (1971) resume

*Infra, pág. 38; inciso b.

ron que alrededor de cuatrocientas especies de artrópodos, mostraban alguna susceptibilidad a B. thuringiensis, clasificando algunos casos como: a) especies sensitivas al cristal solo (principalmente lepidópteros), b) la acción combinada de esporas y cristales (ciertos lepidópteros), c) solamente a las esporas (lepidópteros e himenópteros) y d) a exotoxinas presentes en preparaciones bacterianas (muchas especies de los órdenes anteriores y varios más, incluso fuera de la clase Insecta).

Krieg y Langenbruch (1981), realizaron una extensa revisión sobre la susceptibilidad a B. thuringiensis en artrópodos, a los que agrupó en tres secciones de acuerdo con el o los principios involucrados: 354 especies susceptibles al complejo spora-cristal, 53 a la beta-exotoxina y 16 a formulaciones de esporas y cristales, en las que probablemente estuvo presente la beta-exotoxina. De estos grupos se pueden reunir arriba de 380 especies distintas, con alguna susceptibilidad probada, en campo o en laboratorio, hacia alguna de las tres variantes activas de B. thuringiensis. De esta última cifra, unas 270 son lepidópteros, 50 son dípteros y 20 himenópteros; el resto lo comprenden especies de los órdenes Aphaniptera, Coleoptera, Isoptera, Mallophaga, Orthoptera y Trichoptera, otros fuera de la clase Insecta como Acari y Crustacea e incluso fuera del Phylum Arthropoda como Oligochaeta y Nematoda.

Como se advierte, existe alguna similitud entre los trabajos de Krieg & Langenbruch y Burgerjon & Martouret; estos últimos, sin embargo, efectuaron su revisión tratando de establecer una relación, entre

el espectro de actividad de B. thuringiensis y alguna característica que lo identificara. Así encontraron que diferentes líneas exhibían diversos grados de actividad entomopatogénica; posteriormente con la introducción de la serotipificación, observaron que distintas líneas pertenecientes - al mismo serotipo H, mostraban una actividad específica, como si se tratara de diferentes serotipos. Dulmage et al. (1981) publicaron los avances de un extenso estudio sobre este mismo tema, dentro de un programa - cooperativo internacional y orientado a determinar el espectro de actividad de B. thuringiensis. Este proyecto se fundamenta en que para entender el espectro de acción de este entomopatógeno, se tienen que estudiar muchos aislamientos distintos, serotipificarlos y ensayarlos contra una amplia variedad de insectos.

2.2.3.3. Bacillus thuringiensis Berliner como fuente de toxinas.

Son al menos cuatro los principios tóxicos, experimentalmente comprobados, producidos por las variedades de B. thuringiensis. Heimpel propuso en 1967 una clasificación semejante a aquella, en la que se emplea el criterio de su localización anatómica para denominarlos; esta nomenclatura será parcialmente utilizada para las toxinas de esta bacteria, excepto para el factor-malófaga*, concepto sugerido por Dulmage et al. (1981) para el principio activo en piojos del ganado, reportado por Gingrich -- et al. en 1974 (Gingrich y Haufler, 1978).

* Traducido del inglés "louse factor" en base a que el orden Mallophaga, se conoce generalmente como piojos masticadores.

Aunque se encuentran en la literatura reportes de otros productos de B. thuringiensis, e.g. la gamma-exotoxina, enunciada por Heimpel -- 1967; las proteasas, por Bucher en 1960 e incluso, la posibilidad de - antibiosis estudiada por Vanková en 1957, no existen estudios que con firmen su participación en la patogénesis de hospederos susceptibles - (Lysenko y Kucera, 1971). Por lo tanto, sólo serán tratados la α y - β -exotoxinas, la delta-endotoxina y el factor-molófaga.

a) Alfa-exotoxina. Fue identificada por Toumanoфф en 1953 como leciti nasa-C; es producida también por B. cereus, soluble en agua, termólá- bil y de actividad enzimática y estructural. Aunque ha probado ser tó xica en ciertos insectos, e.g. lepidópteros, es la menos estudiada de bido quizá a que no tiene una actividad consistente (Lysenko y Kucera, 1971 y Dulmage et al., 1981).

b) Beta-exotoxina. En lo sucesivo, el nombre de β -exotoxina será sus tituido por el de thuringiensin, a sugerencia del cuerdo adoptado por investigadores americanos, checoslovacos y franceses, en base a que su reconocimiento como una estructura análoga del ATP, no corresponde en caracter y efecto a una exotoxina (Sebesta et al.). El thuringiensin es soluble en agua, termoestable y de bajo peso molecular; fue reporta do por McConnell y Richards en 1959, quienes demostraron que sobrena- dantes pasados por autoclave, producían mortalidad en G. mellonella, - aplicados por inyección. Burgerjon y de Barjac en 1960, Hall y Araka- wa en 1959 y Briggs en 1960, reprotaron también este principio activo, el cual recibió calificativos como el factor de McConnell y Richards, toxina termoestable y factor-díptera*, entre los más conocidos (Bond - et al., 1971; Dulmage et al., 1981 y Sebesta et al., 1981)

* Traducido del inglés "fly-factor" bajo el mismo criterio adoptado an teriormente, c.f. pág. 37.

Bond et al. (1971) y Sebesta et al. (1981), revisaron ampliamente las características y propiedades químicas del *thuringiensin*; Farkas y colaboradores, propusieron en 1969 su fórmula estructural y Pais y de Barjac establecieron en 1974 su fórmula sintética: $C_{22}H_{32}N_5O_{19}P \cdot 3H_2O$. De Barjac y Dedonder, en 1965 y 1968, purificaron e identificaron al *thuringiensin* como un nucleótido de adenina y algunos análogos han sido sintetizados recientemente (Sebesta et al., 1981).

El *thuringiensin* es, además, altamente inespecífico; mata especies de los órdenes Lepidoptera, Díptera, Coleoptera, Hymenoptera, Isoptera y Orthoptera. El principal signo de su acción, es que a dosis subletales produce anomalías o cambios teratológicos, durante el desarrollo de los insectos. Su generalizada toxicidad afecta también a mamíferos, en los que inhibe la biosíntesis del ARN, interrumpiendo la transferencia de información genética. Estos rasgos han restringido sus posibilidades de uso, al menos en el presente; aunque existen antecedentes de que ha sido utilizado ampliamente en la Unión Soviética (Krieg & Langenbruch, 1981 y Dulmage & Aizawa, 1981).

c) Factor-malófaga. Este producto de *B. thuringiensis*, reportado por Gingrich et al. en 1974, es aún de características químicas y toxicológicas desconocidas. En varios bioensayos produjo mortalidad en piojos masticadores de mamíferos, tales como *Bovicola bovis* (L.), *B. ovis* (L.), *B. limbatus* (Gervais) y *B. crassipes* y se obtuvo de la variedad *kurstaki*, HD-1. Los estudios de Gingrich, dentro del programa cooperativo de Dulmage y colaboradores*, sugieren que su actividad es algo compleja y al parecer se pueden identificar cuatro tipos de toxinas distintas, de acuerdo con su espectro de actividad y termorresistencia (Dulmage et al., 1981).

* Supra, pág. 37, punto 2.2.3.2.

e) Delta-endotoxina. Esta toxina representa el caso contrastante al thuringiensin; reúne características singularmente opuestas; por ejemplo, aunque fue indirectamente reportada por lo menos cincuenta años antes que éste, su estructura química no ha sido determinada del todo. Los "cultivos viejos bien esporulados" reportados por Aoki y Chigasari (1915), corresponden en parte a los extractos producidos en la actualidad; esto es aún más claro si se consideran los filtrados tóxicos obtenidos por Mitani y Watarai en 1916, de B. sotto Ish.; (Heimpel y Angus, 1963). El cuerpo adicional nombrado "restkörper" por Berliner (1915) y Mattés en 1927, es una descripción más aproximada al cuerpo parasporal o cristal proteínico, redescubierto y estudiado por medio de microscopía electrónica por Hannay en 1953 (Cooksey, 1971; Hannay, 1953). Su espectro de actividad es relativamente reducido; es activa contra especies de Lepidoptera y Diptera, lo que ha permitido su uso comercial con seguridad ecológica por más de veinte años (Burgess, 1981).

2.2.4. El cristal parasporal y la toxina proteínica.

Los conceptos cuerpo parasporal, cristal proteínico, toxina o proteína cristalífera, son sinónimos adecuados del cristal producido por las líneas de B. thuringiensis, durante su esporulación. Mientras que el concepto δ -endotoxina, cuya nomenclatura es criticada por Lysenko y Kucera (1971), debe reservarse para la fracción activa relacionada con el cristal, que además resulta ser atóxico hasta no ser disuelto. Su solución mediante amortiguadores de pH, reductores alcalinos, álcalis y algunas enzimas, produce moléculas de distintos tamaños, unas tóxicas y otras no. Sin embargo, la toxicidad no es sólo cuestión de solubilización, pues cuando la toxina disuelta con álcali, se ha aplicado mediante inyección ha resultado atóxica, pero retiene su toxicidad oral (Dulmage y Aizawa, 1982).

2.2.4.1. *Química y estabilidad del cristal.* - Hannay y Fitz-James postularon en 1955 la naturaleza proteínica del cristal; desde entonces, una serie de estudios sobre el contenido de aminoácidos, en el cuerpo parasporal de B. thuringiensis, han sido realizados por diversos investigadores. - Cooksey (1971) y Fast (1981) efectuaron sendas revisiones -- sobre la química del cristal, en distintas variedades del bacilo; en sus estudios concluyeron que ningún aminoácido atípico fue detectado; que nada en la estructura primaria de la proteína explica sus propiedades tóxicas; que la metionina y la cistina son los aminoácidos presentes en las proporciones más reducidas; y que, aunque la relación de los puentes de disulfuro con la insolubilidad, es puesta en duda por Cooksey (1971), debido precisamente al bajo contenido de cistina, su papel en la estabilización es muy probable, como lo sugieren los estudios de Young y Fitz-James, 1959 y Lecadet, 1966, 1967, 1970, citados por Fast (1981), quienes demostraron que la adición de agentes reductores de disulfuro, disminuyeron el pH requerido para disolución hasta dos unidades. Ahora, aunque no ha sido reportado algún estudio sobre el papel, el número o la localización de los puentes de disulfuro, se acepta ampliamente que el cristal es mantenido unido, por intersubunidades hidrofóbicas de cadenas de disulfuro (Fast, 1981 y Burges, 1982).

La ausencia de una unión covalente a la cadena proteínica, su independencia a la toxicidad y los contrastantes reportes sobre su presencia en el cristal, mantienen aún la duda del contenido de carbohidratos en el cuerpo parasporal de B. thuringiensis (Cooksey, 1971 y Fast, 1981). Lo mismo parece ocurrir con las concentraciones de Ca, Fe, Mg y Si, pues con excepción del reporte de Faust *et al.* en 1973, citados por Fast (1981), no existe alguna otra evidencia de su presencia.

La masa del cristal representa poco más del 30% del peso seco del esporangio maduro; su peso molecular fue calculado en 230,000 daltons por Holmes y Monro en 1965 y se trata

de un agregado bipyramidal, con moléculas polipeptídicas de forma elipsoidal, con longitud y diámetro Ca. 15nm y 5nm, -- respectivamente (Norris, 1971 y Fast, 1981). No es inactivado aún a temperaturas de 80°C por 20 minutos, ni por exposiciones superiores a una hora a la acción directa de la luz solar, aunque la toxina solubilizada es desnaturalizada por el calor (Watanabe, Tsutsui e Iwahana, 1967; Cantwell, 1967 y Cantwell y Franklin, 1966; citados por Prasad y Shethna, 1967). Hannay (1953) demostró que precipitantes de proteína, como el ácido tricloroacético y el cloruro de mercurio, inactivaron tanto a los cristales como a las proteínas disueltas y que muchos de los solventes orgánicos, tales como el cloroformo, el metanol y la acetona, inactivaron a las proteínas cristalíferas disueltas.

2.2.4.2. Solubilidad, aislamiento y caracterización de las subunidades tóxicas del cristal. - Angus demostró en 1956 que los cristales inyectados en el hemocele de larvas de B. mori resultaron inocuos; en base a esta observación, sugirió que el cristal es una protoxina que requiere ser activada en el intestino de los insectos (Prasad y Shethna, 1976). Desde entonces, el interés de muchos investigadores se concentró en la o las subunidades tóxicas del cristal. Sin embargo, la solubilización del cristal ha sido, por ella misma, el principal obstáculo para los químicos, quienes deben tener presente la retención de la estructura y la toxicidad de la molécula o moléculas fundamentales. Esto requiere que el cristal debe ser disuelto, sin romper las cadenas covalentes o bien con el rompimiento específico en algunas de ellas (Fast, -- 1981). Distintos métodos de solubilización, química o enzimática, han sido utilizados para la disolución de los cristales; entre ellos el uso de soluciones alcalinas de ditioneitol, cisteína, urea, amortiguadores alcalinos de pH diluidos y jugos intestinales de larvas susceptibles (Cooksey, 1971). Prasad y Shethna (1976) realizaron una sistemática revisión de las investigaciones más sobresalientes, acerca del aisla-

miento e identificación de la subunidad tóxica del cristal. En sus observaciones resumieron que la disolución del cristal, produce subunidades proteicas de pesos moleculares que van desde 1,000 hasta 200,000 daltons, según el método empleado, aunque algunas subunidades no fueron probadas en su toxicidad.

Por otra parte, se ha observado que el uso de soluciones alcalinas para disolver los cristales, con o sin agentes reductores, ha afectado la toxicidad de las subunidades proteicas (Fast, 1981). Y ha sido en base a este hallazgo, -- que mucho se ha avanzado en la química del cristal en poco más de un año, toda vez que Huber y Luthy, citados por Burges (1982), demostraron en 1981 que bajo condiciones cuidadosamente controladas, se puede evitar el pH alcalino para la disolución de los cristales y activación de la endotoxina. Así, recientemente se ha logrado establecer que la subunidad elipsoidal, está integrada por un gran número de cadenas peptídicas, entre las cuales se identifica una con un peso molecular de 120,000 daltons por electroforesis con sodio-dodecil-sulfato (SDS) y 80,000 daltons por centrifugación. Estas, son también mantenidas unidas por intercadenas hidrofóbicas de disulfuro (Burges, 1982).

La toxina de todos los tipos de cristales, hasta ahora analizados, es una protoxina termolábil de 134,000 daltons -- que es activada por hidrólisis; cuando esto ocurre, se produce un péptido tóxico resistente a la acción de la proteasa, con un peso molecular de Ca. 60,000 daltons (Fast, 1981). -- Sin embargo, existen evidencias de que péptidos tóxicos menores de 10,000 daltons, son producidos durante la hidrólisis. Fast y Martin, citados por Burges (1982), encontraron en 1980 que los tipos de cristales de kur-1, thu y sot, se disociaron en péptidos de Ca. 1,000 daltons con una completa retención de su toxicidad.

Después de diversos estudios sobre la biosíntesis del cristal, se ha logrado establecer con claridad, que la mayor formación de cristales ocurre durante los estadios III y IV de la esporulación, *i.e.* cuando la espora joven está siendo rodeada por su membrana, al inicio de la fase estacionaria (Prasad y Shethna, 1976 y Fast, 1981). Una pequeña cantidad de proteína, estrechamente relacionada con la subunidad básica del cristal, ha sido encontrada en el interior de la pared celular, lo mismo que en la cubierta esporal (Aronson, *et al.*, 1982; Delafield, *et al.*, 1968 y Somerville, *et al.*, 1968). Lo anterior ha hecho pensar que la proteína cristalífera, es un constituyente normal de esta bacteria y que es sobreproducida para proveerse de un nicho ecológico, como patógeno de insectos (Somerville, 1978; citado por Fast, 1981). La similitud entre la proteína del cristal y la de la cubierta esporal, no sólo ha sido en sus propiedades químicas y serológicas, sino que han demostrado una toxicidad análoga; -- aunque, las esporas completas son unas mil veces menos tóxicas que los cristales, debido a la reducida proporción de la unidad proteínica en la cubierta esporal (Somerville y Pockett, 1975; citados por Fast, 1981; Schesser y Bulla, 1978).

2.2.4.3. Modo de acción.- La inhibición de la alimentación en larvas, que han ingerido cristales de B. thuringiensis, es el síntoma universal de la actividad de esta bacteria en lepidópteros; de hecho, esto ha sido una propiedad de gran utilidad en las aplicaciones de campo (Burges, 1982). Simultáneos a ese síntoma, se producen desórdenes fisiológicos y patológicos. Dentro de los primeros, se encuentran el aumento en la permeabilidad del mesenterón y los cambios de pH de la hemolinfa y del contenido del tubo digestivo, que en conjunto provocan signos de parálisis intestinal, letargo y parálisis general de la larva; mientras que los segundos, se caracterizan por un incremento de la flora intestinal y la destrucción de las células epiteliales del mesenterón, origi

nando un síndrome de flacidez relacionado con una septicemia con consecuencias letales (Angus, 1962; Cooksey, 1971 y Heimpel & Angus, 1963). A pesar de estos conocimientos y de una gran cantidad de estudios sobre el modo de acción, revisados ampliamente por Cooksey (1971), Fast (1981) y Heimpel y Angus (1963), no se ha logrado establecer con toda claridad el sitio primario en el que actúa la toxina, para desencadenar la serie de eventos bioquímicos y fisiológicos, que originan la destrucción de la membrana peritrófica y de las células epiteliales del mesenterón. La hipótesis más reciente es la que sostuvo Fast (1981); fue formulada en base a la toma de glucosa que se observa, en las células epiteliales del intestino, dentro del primer minuto posterior a la dosificación con cristales (Fast y Donaghue, 1971; citados por Fast, 1981). Los puntos básicos de ella son: "...La toxina actúa en la superficie de las células epiteliales y provoca una pérdida rápida de ATP de ellas, estimulando la respiración y toma de glucosa. Poco después el crecimiento bacteriano aumenta y los ápices celulares empiezan a proyectarse hacia el lumen. La alimentación es inhibida durante el abultamiento celular y la interrupción metabólica de las células epiteliales se produce, virtualmente, para los diez o quince minutos después del tratamiento, cuando ocurre el escape de iones del lumen a la hemolinfa. La parálisis y/o la muerte se produce por el desbalance iónico en la hemolinfa..." El mecanismo de cómo es activada la toxina y reduce el ATP intracelular, está aún sin explicar. La hipótesis de que la toxina actúa directamente sobre las mitocondrias de las células epiteliales fue rechazada por estudios especialmente diseñados, para demostrar si la toxina penetraba o no a la célula; mientras -- que la suposición de que los iones, por su función enzimática durante el proceso oxidativo de la respiración, podrían originar la pérdida de ATP como resultado de una actividad homeostática de las células, a medida que éstos eran transportados por la toxina del interior al exterior de ellas, es

descartada debido a que la pérdida de iones ocurre 1.0 a 1.5 minutos después del tratamiento, mucho después de la toma de glucosa.

2.2.5. Producción de un insecticida a base de Bacillus thuringiensis Berliner.

La fermentación sumergida es la tecnología más utilizada en la actualidad, para la biosíntesis comercial de esporas y cristales de B. thuringiensis (Burgess, 1982). El proceso completo comprende principalmente tres importantes etapas (Figura 1); éstas son: las actividades de laboratorio, en plantas piloto y en plantas comerciales. Las tres pueden traslaparse en el tiempo, y éste puede prolongarse por cuatro o cinco años, antes de la comercialización del bioinsecticida (Ignoffo y Anderson, 1979). No obstante, Dulmage (1971), en un concienzudo análisis de costos, estimó en un 20% más económica la producción de un insecticida microbial que un químico. De acuerdo con la figura 1, la fase en que se encuentran las investigaciones sobre todas las cepas de B. thuringiensis, aisladas en la Facultad de Biología de la U.A.N.L., es la de laboratorio. Así, la revisión de literatura en este punto se orientó a los antecedentes en pruebas de medios y bioensayos a ese nivel.

2.2.5.1. Medios de fermentación.

- Los medios definidos y semidefinidos son importantes para los estudios de metabolismo y crecimiento de B. thuringiensis; sin embargo, para la producción comercial de cristales y esporas de esta bacteria, como de cualquier agente de control microbial, se requiere el uso de sustratos económicos que reduzcan y hagan redituable el financiamiento tecnológico (Norris, 1971). Materias primas como melaza, líquido de remojo de maíz, harina de pescado y harina de soya, proveen los elementos nutritivos, energéticos, vitamínicos e incluso algunos factores de crecimiento para la biosíntesis cristalífera Anónimo, 1960; cita

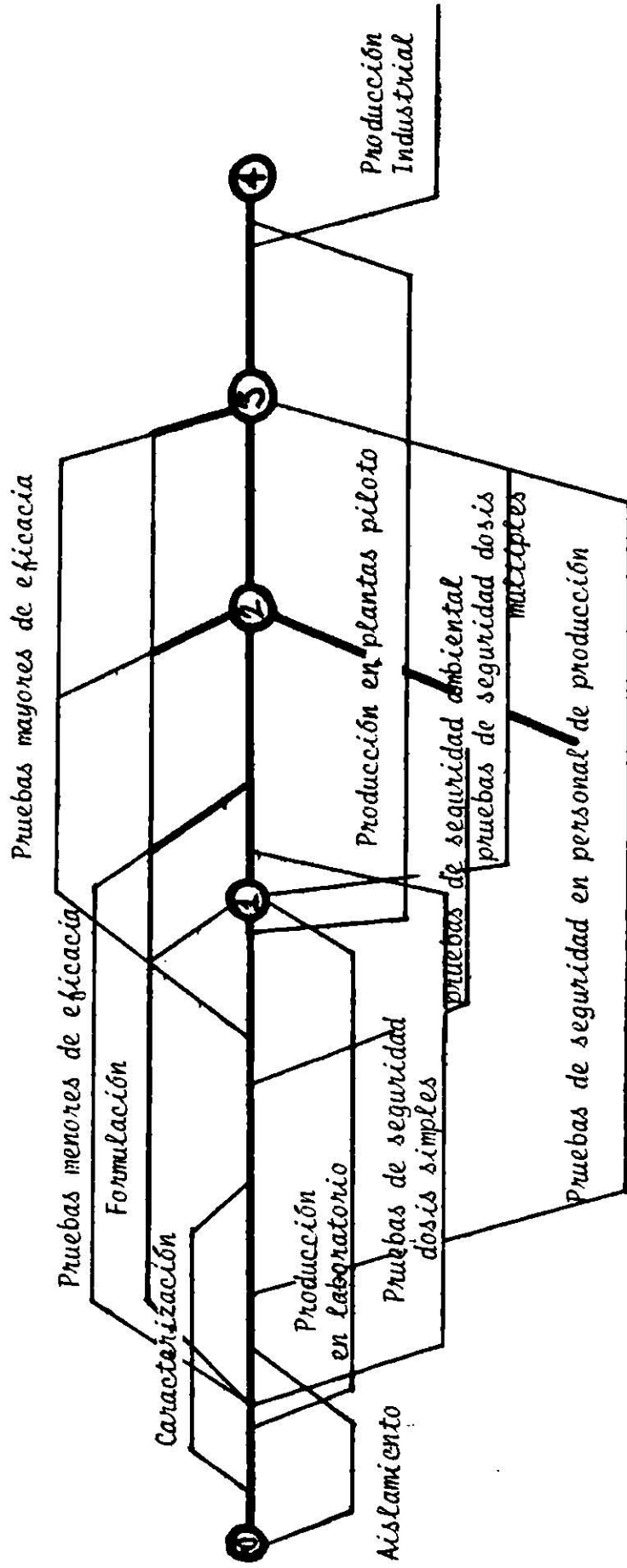


Figura 1. Etapas que comprende el desarrollo de un entomopatógeno hasta insecticida microbial.

Fuente: Ignoffo y Anderson (1979).

do por Briggs, 1963; y Norris, 1971).

Obligatoriamente las células microbianas requieren de carbono como sustrato energético básico, para la síntesis de nuevo material celular; además, el carbono determina el nivel de los compuestos de nitrógeno en el medio (Dulmage y Rhodes, 1971). Scherrer, Luthy y Trumpf (1973) encontraron que distintas concentraciones de glucosa, influyeron en el tamaño, el contenido proteínico y la actividad insecticida de B. thuringiensis y concluyeron que el rango óptimo de glucosa fue de 0.6 a 0.8%. Sin embargo, la actividad tóxica, medida en número de cristales necesarios para inhibir en un 100% la alimentación larvaria de P. brassicae, no aumentó en la misma proporción con que lo hizo el contenido de proteína cristallífera y el mejor medio fue en el que se utilizaron 0.8% de glucosa.

Singer, Goodman y Rogoff (1967) observaron una pobre esporulación -- con la misma variedad thuringiensis, utilizando 1% de glucosa; mientras que al sustituirla por una mezcla de aminoácidos lograron un 80 a 90% de esporulación a las 24 horas, aunque el crecimiento disminuyó hasta el 50% en relación al obtenido con el carbohidrato. Los resultados de este estudio, aparentemente contradictorios al anterior, en realidad reafirman las necesidades de carbono para la síntesis celular, como puede deducirse de la reducción en el crecimiento al suprimir la glucosa. Lo que tal vez -- originó la pobre esporulación en el medio con glucosa, fue que Singer y colaboradores no utilizaron un adecuado balance en la fuente de nitrógeno, o quizá el uso de 0.2% de extracto de levadura, un importante complejo de vitamina B, en el medio de Scherrer y colaboradores y no en los de Singer, influyó en la diferencia parcial de sus resultados, pues el resto de los componentes de sus medios fueron casi los mismos.

Pendleton, citado por Norris (1971), reportó en 1969 un exitoso medio a base de harina de pescado, 2%; almidón, 1%; carbonato de calcio, -- 0.1%; niacina, 0.001% y una mezcla de sales. Además Dulmage y Rhodes -- (1971) realizaron una revisión de varias fórmulas, patentadas durante la década de 1960; entre ellas la de Megna en 1963, compuesta por melaza de betabel, 1.86%; harina de semilla de algodón, 1.4%; líquido de remojo de malz, 1.7% y carbonato de calcio, 0.1%. Un proceso patentado por Drake y Smithe en 1963, se fundamentó, a diferencia con el de Megna, en que se

pueden utilizar hasta 3 y 4 veces más la cantidad de sólidos en el medio. Además, los componentes utilizados por Drake y Smythe fueron distintos: - almidón de malz, 6.8%; sacarosa, 0.64%; caseína, 1.94%; remojo de malz, - 4.7%; levadura, 0.6% y amortiguadores de pH a base de fosfatos, 0.6%. No obstante, en ambos medios, en ambos procedimientos se obtuvieron resultados similares en rendimientos, aunque no proporcionaron datos de sus pruebas de actividad.

Dulmage, citado por Dulmage y Rhodes (1971), estudió en 1970 la producción y actividad de doce variedades de *B. thuringiensis*, desarrolladas en dos medios distintos (Tabla VII). De este estudio, Dulmage concluyó -

Tabla VII. Medios utilizados por Dulmage en 1970, para la fermentación - de doce variedades de *Bacillus thuringiensis*.^a

Sustrato ^b	Medio de triptona	Medio de semilla de algodón
Triptona	1.0 %	
Proflo		1.0
Bacto-peptona		0.2
Dextrosa	0.5	1.5
Almidón de malz	0.5	
Extracto de levadura	0.2	
K ₂ HPO ₄	0.1	
KH ₂ PO ₄	0.1	
MgSO ₄ ·7H ₂ O		0.03
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0.002
ZnSO ₄ ·7H ₂ O		0.002
CaCO ₃		0.1

^aFuente: Dulmage y Rhodes (1971).

^bEn 100 ml. de agua destilada.

que la actividad insecticida dependió tanto de la variedad como del medio, aunque ningún medio y ninguna línea fue superior. Sin embargo, la mayoría de las variedades o líneas produjeron mayor cantidad de cristales en

los medios a base de harina de semillas de algodón, pero la producción no estuvo relacionada con la actividad insecticida. Rogoff et al., citados por Dulmage (1971), hablan observado ya resultados similares a los anteriores.

Dulmage (1971) demostró que la variación en los rendimientos de esporas y cristales y la actividad insecticida, se da aún en aislamientos del mismo serotipo. Usando básicamente los mismos medios, evaluó la producción de la δ -endotoxina en dieciocho aislamientos; dieciséis de la variedad alesti y dos de la variedad kurstaki, demostrando además que el número de esporas no refleja la potencia de los extractos. Un tercer medio - probado por Dulmage en 1970 y 1971, a base de harina de soya, 1.5%; dextrosa, 0.5%; almidón de maíz, 0.5% e iguales concentraciones para el resto de los componentes del medio de harina de semillas de algodón, fue descartado por este autor. En esta ocasión Dulmage y de Barjac, encontraron que un medio a base de harina de semilla de algodón, peptona, remojo de malz, glucosa, extracto de levadura y las mismas concentraciones de sulfatos y CaCO_3 del medio de algodón de la tabla VII*, produjo los rendimientos más elevados, nunca antes obtenidos, sobre todo con la cepa HD-187 serotipo 5a5b, que resultó superior en rendimientos y potencia que la HD-73 y la HD-1, ambas del serotipo 3a3b (Dulmage y de Barjac, 1973).

Salama et al. (1981) probaron medios compuestos con subproductos orgánicos sin ningún otro sustrato, reportando 80 a 100% de mortalidad en Heliothis armigera (Boddie), con dosis de 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta, de preparaciones con el complejo spora-endotoxina originadas por la var. kurstaki, fermentada con levaduras de forraje, sangrado de res y residuos caseros de carne. También observaron que la mayoría de las formulaciones derivadas de fermentaciones, cuya única fuente de nitrógeno fueron semillas de leguminosas, contuvieron altos rendimientos y una actividad relativamente alta; por ejemplo, las CL_{50} contra Spodoptera littoralis (Bois.) de preparaciones de la var. entomocidus, producidas en medios con garbanzo, harina de frijol y cacahuate, fueron respectivamente 93.4, 93.4 y 110.0 $\mu\text{g/ml}$ de dieta.

* Supra, pág. 49.

Sánchez Marroquín (1971) encontró que medios de cultivo a base de jugo de agave, solo o enriquecido con sales nitrogenadas, produjeron una aceptable cantidad de proteína celular con cinco especies de levaduras. En base a esto, Maldonado (1980) experimentó la producción de esporas y cristales con la cepa GM-1 de B. thuringiensis, utilizando 1% de jugo de agave y 1% de harina de soya. El crecimiento, la esporulación y la actividad se comparó contra el medio B-4b del Dr. Dulmage, encontrando resultados de crecimiento un tanto similares y potencias no mayores de 10,900 UI en extractos de los medios con jugo de agave, por 6,960 en el medio B-4b.

Murga (1983) ensayó un medio a base de harina de soya, 1%; agua de cocimiento de levadura, 0.01%; $MgSO_4$, 0.002%; $CaCO_3$, 0.01%; $FeSO_4$, - - - 0.002%; $ZnSO_4$, 0.002%, con el cual encontró una actividad máxima de 32% de mortalidad en Trichoplusia ni. Arroyo (1982) utilizó 0.2% de peptona, 0.05% extracto de levadura, 0.03% $MgSO_4$, 0.1% $CaCO_3$, e idénticas concentraciones que el anterior para el resto de los sulfatos, para producir esporas y cristales de la GM-2, con la cual encontró actividades tan bajas como 4% de mortalidad en T. ni. Amparán (1982) encontró 44% de mortalidad en S. frugiperda, con extractos producidos en un medio a base de melaza, líquido de remojo de malz, harina de soya y otro medio a base de harina de soya, agua de cocimiento de levadura, jugo de agave.

2.2.5.2. Recuperación del complejo spora-cristal.- Dulmage, Cornea y Martínez (1970), estudiaron ampliamente la eficiencia para recuperar esporas y cristales, de las fermentaciones de diez variedades de B. thuringiensis, desarrolladas en dos medios distintos. Su método, conocido como "coprecipitación con lactosa", demostró un promedio de recuperación

del 60% y eliminó los problemas de apelmazamiento de los extractos, comunes en otros métodos hasta entonces reportados. Dulmage y sus colaboradores, observaron también que el peso seco de los extractos aumentó hasta en cuatro veces, el peso de la lactosa usada y los filtrados de la concentración más alta fueron resuspendidos con mayor facilidad en agua. Este método de recuperación ha sido el más empleado hasta ahora; sin embargo, contrario a lo que se había supuesto, el proceso de extracción parece no eliminar las exotoxinas solubles en agua, secretadas normalmente por las líneas de B. thuringiensis durante su crecimiento, según lo han demostrado los estudios de Gingrich, citado por Dulmage, et al. 1981, quien encontró que varias formulaciones de la HD-1, extraídas mediante tal método, fueron activas contra Haematobia irritans (L.), debido quizá a la presencia de la β -exotoxina, pues la β -endotoxina de HD-1 no es activa contra malófagos (Dulmage, et al. 1981). Esto podría hacer necesario que se indaguen nuevos procedimientos de extracción en el futuro.

2.2.5.3. Estandarización de las recuperaciones.- Burges y Thomson (1971) definieron la estandarización como la adopción de las unidades más apropiadas, para medir la potencia insecticida de una preparación patogénica. Durante el desarrollo de B. thuringiensis hasta insecticida microbial, se emplearon tres métodos para tratar de cuantificar su principio activo y relacionarlo con su actividad entomopatógena; éstos han sido: microbiológicos, el conteo de esporas; químicos, la determinación del ácido dipicolínico; y serológicos, reacciones antígeno-anticuerpo con la proteína cristalífera (Fisher, 1963). De los anteriores, solamente la serología de los cristales conserva una gran posibilidad de ser utilizado

en un futuro no lejano, gracias a los estudios de Krywienzczyk, 1977 y -- Krywienzczyk et al., 1979. Mientras que el conteo de esporas, sólo es empleado en el presente como método auxiliar, en extractos de una misma -- fermentación, ya que el número de esporas no está relacionado con la acción del complejo en distintas formulaciones, aunque éstas procedan de -- un medio similar (Burges, 1966). Y por otra parte, la determinación de ácido dipicolínico ha sido de poco valor, ya que se trata de un constituyente normal de la cubierta esporal y por lo tanto puede ser relacionado con el número de éstas, más no con la actividad tóxica (Fisher, 1963).

El bioensayo con una especie de insecto susceptible, es el mejor mecanismo para medir la potencia de diversos extractos de B. thuringiensis (Burges, 1966 y Burges y Thomson, 1971). De acuerdo con Finney (1977) -- bioensayo o ensayo biológico, es la medida de la potencia de las reacciones que produce en materia viva, cualquier estímulo físico, químico o -- biológico, fisiológico o psicológico. La potencia del complejo esporal de B. thuringiensis, puede ser determinada por medio del bioensayo, debido a que su actividad es resultado de una toxina, la cual se -- comporta como insecticida estomacal (Burges, 1966). El bioensayo consiste en una prueba que incluye una serie de dosis, añadidas a un medio artificial o natural en el que deben alimentarse libremente los insectos, cuyo número por dosis puede ser de 15 a 30. Las respuestas son registradas esencialmente en porcentajes de mortalidad, los que posteriormente -- son transformados a unidades "probit", para graficarse contra los logaritmos de las dosis, en el eje "X". La línea resultante es aproximadamente recta y creciente, lo que permite predecir la potencia del producto -- en una dosis determinada. La teoría de esta metodología fue ampliamente

tratada por Finney (1977); la funcionalidad de la línea de regresión en unidades "probit-log", se basa en que la distribución de frecuencias de la tolerancia en insectos a un estímulo dado, e.g. un insecticida, cuando se grafica como una curva de respuesta cuantal, i.e. de ocurrencia o no ocurrencia, es asimétrica pero fácilmente transformada a una normal. Así, la distribución binominal de probabilidades, característica de sólo dos eventos posibles, de que ocurra o no la muerte de "r" insectos de un grupo "n", respondiendo independientemente a una dosis "x" de un estímulo dado, se puede poner a prueba con los parámetros regulares de la curva de Gauss o normal; éstos son: media = 0 y varianza = 1. De esta manera la curva que se obtiene al graficar los datos en su escala original, % de mortalidad y dosis (*), se convierte primeramente en una sigmoide normal, cuando son utilizados los logaritmos de las dosis en la abscisa y los porcentajes de mortalidad como ordenada. Cuando estos últimos son -- transformados a una escala conocida como probit -unidades de probabilidad- por medio de la fórmula $Y = 5 + 1/\sigma (x - M)$, modificada por Bliss en 1934, de la originalmente propuesta por Gaddum en 1933, como $Y = (x - M)/\sigma$, los puntos se disponen en una línea recta con la cual se facilita la interpretación de los datos y se puede estimar la DL_{50} con aceptable precisión (Finney, 1977 y Hoskins & Craig, 1962).

La susceptibilidad a un estímulo dado puede ser influida por otros factores, independientes a la dosis; tales como el tiempo de exposición, condiciones ambientales, estado fisiológico del organismo, estado nutricional y genotipo, entre los más importantes (Hoskins y Craig, 1962). To dos éstos y cualquier otro factor que se sospeche interfiera durante un

(*) Infra. pág. 113.

bioensayo, deben ser controlados; de hecho la mayoría se puede regular, con excepción si acaso de la variabilidad genética, tanto de la especie de insecto como de las líneas de B. thuringiensis. Es precisamente en este aspecto del bioensayo en el que se tuvieron que introducir y/o mejorar varios procedimientos; desde los métodos de estandarización propuestos por Burgerjon y Yamvrias (1959) y Burgerjon (1962), para desarrollar un estándar europeo -E61 contra Pieris brassicae-; hasta el bioensayo de la HD-1 con Trichoplusia ni, propuesto por Dulmage et al. (1971), que originó el estándar americano HD-1-S-1971. La formulación de un estándar debía tener obligatoriamente las siguientes características: una actividad alta y bien determinada, consistente y que fuera capaz de conservar sus propiedades por tiempo indefinido, bajo condiciones de almacen. De esta manera podrían ser estudiadas las actividades de distintas formulaciones, correspondientes a diferentes líneas y en condiciones variantes de una fecha a otra. El estándar junto con la formulación prueba eran -- bioensayados simultáneamente y se obtenía un Índice de actividad para la preparación probada, al relacionar la DL_{50} o CL_{50} del estándar con la suya. Este Índice permite absorber la variabilidad intraespecífica de los insectos ensayados, así como las desviaciones en ambiente, pues una proporción entre la CL_{50} del estándar y la de la formulación probada, variará menos a lo largo de las distintas repeticiones, que cualquiera de los datos por separado (Sun, 1950). Para representar la potencia fue necesario codificarla inicialmente de manera arbitraria; así, al primer estándar internacional, E61 var. thuringiensis, le fue asignado un valor de 1,000 unidades internacionales [UI] por miligramo, bioensayado con P. brassicae (Burgerjon, 1962 y Burges, 1966); posteriormente la cepa HD-1 var. kurstaki fue estandarizada contra el E61 y se le estimó una poten--

cia media de 18,000 UI/mg, denominándosele HD-1-S-1971 para ser usado en los Estados Unidos de América (Dulmage, et al., 1971 y Dulmage, 1973).

2.3. Bacillus thuringiensis Berliner en relación con Spodoptera frugiperda (Smith).

Aunque B. thuringiensis ha sido plenamente identificado como patógeno de lepidópteros, su actividad contra S. frugiperda al igual que en otros noctélidos, es discutible. Antes de tratar los contados antecedentes sobre este tema, se presentan a continuación algunos aspectos importantes, relacionados con esta plaga agrícola.

2.3.1. Generalidades sobre Spodoptera frugiperda (Smith).

2.3.1.1. Importancia económica, tipo de daño y distribución geográfica.- El gusano cogollero, S. frugiperda, ocasiona sus mayores daños en maíz y sorgo, en los que origina diversas pérdidas según el área que se trate, siendo más intensas en las zonas tropicales a subtropicales (Dirección General de Sanidad Vegetal, 1979; 1980). El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, citado por Núñez (1980), reportó en 1977 que los daños económicos provocados por esta plaga en maíz, en el Estado de Quintana Roo, alcanzaron porcentajes del 46.6, mientras que asociada con otros insectos en sorgo, en los Estados de Guanajuato, Jalisco, Nayarit, Sinaloa, Sonora y Tamaulipas, ocasionó pérdidas del orden del 30 al 50%. Aunque la Dirección General de Sanidad Vegetal (1980), aseguró que en diversas evaluaciones de daños en sorgo, se encontró que éste resistió bastante bien la defoliación por cogollero y no disminuyó su rendimiento. Núñez (1980) concluyó en su revisión de plantas hospederas de S. frugiperda, que éste redujo los rendimientos desde un 10 hasta 100%, según la

oportunidad con que se practicaran las medidas de control y el cultivo - en que incidiera.

Los anteriores datos son en cierta forma explicables, si se considera la observación con respecto al tiempo de aplicar las medidas de combate, así como el hecho de que se trata de datos nacionales, en muchos medios propicios para la biología de S. frugiperda. Sparks y Mitchel (1976) estimaron que esta plaga originó pérdidas del 2%, en las regiones maiceras de los Estados Unidos de América, aún cuando se aplicaron medidas de control. Esta cifra, relativamente baja, representó el 16.6% del total de pérdidas, ocasionadas por un complejo de más de 15 especies de insectos perjudiciales en este cultivo. S. frugiperda ocupó el segundo lugar, junto con los gusanos de las raíces del género Diabrotica, y el barrenador europeo, Ostrinia nubilalis (Hübner) y sólo después de Heliothis zea (Boddie) con 20.8% del total de daños.

Quizá lo que hace que el gusano cogollero sea la plaga más importante del maíz en México, es que se presenta un ciclo tras otro y el intenso daño que ocasiona en este cultivo. Conocido normalmente como defoliador en hojas extendidas de plántulas o del cogollo, durante sus dos primeros estadios; para el tercero a quinto puede destruir el corazón de -- las plantas o la espiga temprana; también puede ocasionar daño en el elote, penetrando por la base ó del mismo modo que lo hace el gusano elotero (Dirección General de Sanidad Vegetal, 1980; Metcalf y Flint, 1965). Sin embargo, el período crítico de su ataque es durante los primeros 40 a 50 días, i.e. cuando la planta tiene de 30 a 40 cm de altura.

A pesar de que S. frugiperda es una especie neotropical, se puede dispersar muy al norte y al sur del ecuador y es capaz de sobreinvertar en estas latitudes a lo largo de las zonas costeras y en regiones donde el invierno sea benigno y no endurezca el suelo por efecto de hielo (-- Little, 1972; Margheritis & Rizzo, 1965 y Metcalf & Flint, 1965). De acuerdo con la Dirección General de Sanidad Vegetal (1979), el gusano cogollero causa mayores daños en los estados del sur de la República Mexicana, desde Michoacán, Guanajuato y Veracruz, hasta los peninsulares en Yucatán, Campeche y Quintana Roo, exceptuando de este grupo a Tabasco, -- Puebla, Tlaxcala, Querétaro e Hidalgo; mientras que en el norte, los estados de Baja California Sur y Norte, Coahuila, Chihuahua y Durango, son los más perjudicados.

2.3.1.2. Identificación.- La descripción, la identificación y la nomenclatura, son pasos secuenciales y básicos de la taxonomía; el objetivo de este punto, sin embargo, es solamente el de reunir las características morfológicas del adulto y el estado larvario de S. frugiperda, en orden de corroborar la identidad del organismo estudiado en el laboratorio, en la investigación con B. thuringiensis. De acuerdo con Borror, DeLong y Triplehorn (1976) y Peterson (1962), la categoría taxonómica de S. frugiperda (Smith) es la siguiente:

Phyllum	Arthropoda
Subphyllum	Mandibulata
Clase	Insecta
Subclase	Pterygota
División	Endopterygota
Orden	Lepidoptera
Suborden	Frenatae
División	Macrolepidoptera

Superfamilia	Noctuoidea
Familia	Noctuidae
Subfamilia*	Acrionictinae
Tribu*	Prodeninii
Género	<u>Spodoptera</u>
Especie	<u>frugiperda</u>

Holland (1968) señaló cuatro sinónimos de la especie frugiperda, -- descritos por diferentes autores: macra Guenée, signifera Walker, plagiata Walker y autumnalis Riley.

a) Familia Noctuidae.

La diferenciación de los adultos de las familias de Lepidoptera, se basa fundamentalmente en la venación de sus alas; así, la principal característica de la familia Noctuidae se encuentra en sus alas posteriores, en las que la Sc y Rs se encuentran unidas durante una corta distancia, después de una reducida areola basal, separándose ampliamente antes de la parte media de la celda discal. La Sc con base normal, no ensanchada; la vena del cubito, en las mismas alas posteriores, ramificándose 3 o 4 veces. La M₂ presente o ausente, con frecuencia débilmente marcada. Otra característica de la venación, no exclusiva de esta familia, es que la M₂ en las alas anteriores, nace más cerca de la M₃ que de la M₁ y la del cubito se ramifica 4 veces (Borror, DeLong y Triplehorn, 1976).

b) Spodoptera frugiperda (Smith).

El adulto del gusano cogollero es una palomilla muy semejante, en coloración y tamaño, a la de los gusanos cortadores; tiene una extensión

* Proporcionados por Doperto, 1964; citado por Gómez (1980).

alar de Ca. 3.75 cm; las alas posteriores son de color blanco grisáceo y las anteriores gris oscuro, presentando manchas claras y oscuras que le confieren una apariencia moteada. En los extremos superiores de las alas frontales, presentan una notoria mancha blanca o casi blanca. (Little, - 1972; Margheritis & Rizzo, 1965 y Metcalf & Flint, 1965).

Peterson (1962) y Rings & Musick (1976) describieron la morfología de la larva, completamente desarrollada, de S. frugiperda; su cuerpo eruciforme es de Ca. 3.5 cm de longitud y de 4.5 mm de ancho. Aunque su coloración puede variar desde rosáceo hasta casi negro, pasando por tonalidades amarillentas, verdosas, grisáceas y cafés, el color café-oscuro es el más típico. Tres líneas blanco-amarillentas, angostas y tenues, una en el centro y otra en cada región dorso-lateral, recorren longitudinalmente su cuerpo; la línea del centro, más pálida y angosta. El dorso, cubierto con setas y pínaculos café-oscuros o negros, es más pálido que el área supraespiracular, la cual es más oscura en los márgenes próximos al dorso y tiene la apariencia de una banda negra interrumpida en cada segmento abdominal. Una banda ancha amarillenta o blanquecina, débilmente definida y moteada con pequeñas manchas café-rojizo, recorre la región subespiracular.

Su cabeza grisácea, crema, amarillenta o café, con áreas adfrontales y márgenes adyacentes de color blanco; cubierta con reticulaciones oscuras en su mayor superficie, y cremas o blancas en la región adfrontal. La piel presenta muy pocos gránulos convexos y redondos; los espiráculos pálidos, rodeados con blanco. Tubérculos setígeros grandes, casi planos y pigmentados con oscuro. Peterson (1962) proporcionó, además de la descripción cefálica, características morfológicas de uñas tarsales -

en patas anteriores, del área mesial de la mandíbula derecha, del mesotórax y del cuarto segmento abdominal en sus regiones laterales, para diferenciar a S. frugiperda de Cirphis unipuncta Haw. y Nephelodes emmedonia Cram.

Por otra parte, Levy y Habeck (1976) establecieron un grupo de claves para distinguir larvas de siete especies de Spodoptera. Estas claves se elaboraron con larvas provenientes de adultos plenamente identificados y han sido probadas satisfactoriamente, para reconocer larvas hasta de cuarto estadio colectadas en el campo, resultando útil para las siete especies, aunque no para todos los especímenes, debido a la variación intraespecífica. Las características morfológicas en que se basan las claves, son fácilmente percibidas con lupa o estereoscopio; así, por ejemplo, S. frugiperda presenta pináculos dorsales conspicuos, con un diámetro mayor o igual a la amplitud espiracular; rasgos anatómicos que las otras seis especies no los presentan.

2.3.1.3. Hospederos, ciclo biológico y hábitos.

Aunque las larvas de S. frugiperda se alimentan de una gran variedad de plantas suculentas, muestran una marcada preferencia por las gramíneas, dañando muchos cereales y zacates a tal grado que en ocasiones se le ha llamado "gusano de los pastos" (Holland, 1968 y Metcalf & Flint 1965). El hábito larvario de emigrar cuando el suplemento alimenticio se agota, hace que el gusano cogollero provoque daños en cultivos hortícolas como nabo, espinaca, jitomate, col, pepino, cebolla y en otros cultivos de campo como alfalfa, algodón, frijol, cacahuate, papa, camote, chícharo, tabaco y trébol (Davidson & Peairs, 1966 y Metcalf & Flint, --

1965).

El tiempo que requiere una generación de S. frugiperda puede variar, según las condiciones climáticas, desde menos de un mes hasta dos. La vida de los adultos puede durar 10 a 14 días, pero en este corto período -- pueden volar cientos de kilómetros y las hembras depositar en promedio -- 1,000 huevecillos, en masas de unos 150 sobre las plantas hospederas o -- cerca de ellas. Las palomillas son esencialmente nocturnas, mientras que las larvas desarrollan una gran actividad durante el día. El período de -- incubación de los huevecillos en clima caliente, puede ser de tan sólo -- dos días. El estado de larva puede variar de 12 días hasta un mes, de a-- cuerdo con las condiciones ambientales. El estado de pupa, bajo clima cá lido, tarda de 8 a 10 días, los que normalmente permanece unos 3 cm en -- el interior del suelo. En las regiones del norte o sur del Ecuador, con inviernos fríos, solamente una generación es abundante, pero en las sub-- tropicales a tropicales se pueden presentar desde 5 hasta 11 generacio-- nes (Little, 1972; Margheritis & Rizzo, 1965 y Metcalf & Flint, 1965).

2.3.1.4. Métodos de control.

De acuerdo con los hábitos de dispersión y pupación de S. frugiper-- da, los factores climatológicos de bajas temperaturas y lluvias, así como la gran cantidad de enemigos naturales reportados (Tabla VIII) que regu-- lan sus poblaciones, es razonable inferir que los métodos culturales y -- biológicos son los idóneos para el combate del gusano cogollero. El Insti-- tuto Nacional de Investigaciones Agrícolas (CIAGON) y la Academia Nacio-- nal de Ciencias de los Estados Unidos, citados por Núñez (1980), recomien-- dan diversas prácticas agronómicas, entre las más importante: araduras, -

Tabla VIII. Insectos depredadores y parásitos de Spodoptera frugiperda (Smith).^a

Nombre científico	Orden	Familia
<u>Ophion bilineatus</u> (Say)	Hymenoptera	Braconidae
<u>Chelonus texanus</u> (Cress)	Hymenoptera	Braconidae
<u>Meteorus laphygmae</u> (Vier.)	Hymenoptera	Braconidae
<u>Apanteles marginiventris</u> (Cress)	Hymenoptera	Braconidae
<u>Trichogramma minutum</u> (Riley)	Hymenoptera	Trichogrammatidae
<u>Euplectrus</u> spp.	Hymenoptera	Eulophidae
<u>Winthemia quadripustulata</u> (Fab.)	Diptera	Tachinidae
<u>W. rufopicta</u> (Bigot)	Diptera	Tachinidae
<u>Calosoma calidum</u> Fab.	Coleoptera	Carabidae
<u>C. scrutator</u> Fab.	Coleoptera	Carabidae
<u>C. sayi</u> Dej.	Coleoptera	Carabidae
<u>Harpalus pennsylvanicus</u> Dej.	Coleoptera	Carabidae
<u>Tetracha carolina</u> L.	Coleoptera	Cicindelidae
<u>Cicindela sexguttata</u> Fab.	Coleoptera	Cicindelidae
<u>Nabis ferus</u> L.	Hemiptera	Nabidae
<u>Podisus maculiventris</u> Ssy	Hemiptera	Pentatomidae

^aFuentes: Davidson & Peairs (1966) y Hofmaster & Greenwood (1949).

fechas de siembra, eliminación de hospederos alternantes, uso de variedades resistentes y rotación de cultivos. Por otra parte, Hofmaster y Greenwood (1949) reportaron un caso natural típico de control biológico en S. frugiperda, por diversos insectos depredadores en un sembrado de dieciséis hectáreas de sorgo. Las especies observadas fueron larvas de la familia Carabidae: Calosoma calidum Fab., C. scrutator Fab., C. sayi Def. y Harpalus pennsylvanicus Dej., con la primera de éstas, encontrándose en una proporción de 75%. Chapman y Glaser, citados por Steinhaus (1949), reportaron en 1915, que Laphygma frugiperda (A. & S.) fue susceptible al virus de la polihedrosis, al observar una epizootia de larvas del último estadio colgando de los ápices de hojas de zacates.

No obstante el potencial biológico y cultural para contrarrestar las infestaciones de S. frugiperda, la realidad es que el uso de diversos productos químicos ha sido el sistema de control más utilizado. Así, en maíz, sorgo y diversos zacates forrajeros, el combate de S. frugiperda se ha practicado con sevin al 5% en dosis de 8 a 12 kg/ha o paratión metílico al 50% en dosis de 1 a 1.5 l/ha. En hortalizas el uso de lannate al 90% a razón de 0.3 a 0.4 kg/ha o azodrin al 5% y 1 a 1.5 l/ha (Dirección General de Sanidad Vegetal, 1979; 1980; 1982).

2.3.2. Estudios de la actividad de B. thuringiensis contra S. frugiperda.

Son realmente muy escasos los antecedentes sobre la actividad de B. thuringiensis contra S. frugiperda. Aparte de los estudios de Núñez (1980) y Castro (1982), tratados con anterioridad*, sólo existen los re-

* Supra, pág. 12; punto 2.1.6. pass.

portes señalados por Krieg y Langenbruch (1981) de los siguientes autores: Figueiredo et al. en 1960 y Dulmage en 1973 encontraron susceptibilidad de S. frugiperda, a las variedades thuringiensis y darmstadiensis durante pruebas de laboratorio; Figueiredo et al. en 1960 y Creighton et al. en 1972, reportaron actividad en campo en las variedades thuringiensis y kurstaki; mientras que Dulmage reportó en 1973 que la variedad toumanoffii fue totalmente inactiva en pruebas de laboratorio. Por otra parte, la cepa HD-129, serovar 5a5b galleriae aislada por Burges, de Galleria mellonella, fue reportada en Egipto como activa contra S. frugiperda (R. Rivas*, comunicación personal). Sin embargo, no existen antecedentes sobre el uso comercial de alguna variedad de B. thuringiensis contra esta plaga.

* ARS, SR, Subtropical Texas Area, Cotton Insect Unit, Brownsville, Tx. - 78520, U.S.A.

MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización del estudio.

La investigación comprendió dos etapas, que consistieron en producción de los extractos y pruebas de toxicidad. La primera se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología Industrial y del Suelo, de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León; mientras que la segunda, se realizó en el Laboratorio de Cría Masiva de Insectos, de la Facultad de Agronomía de la misma universidad en Marín, N.L.

3.2. Materiales utilizados.

Aunque durante la descripción de los procedimientos en el desarrollo del estudio, se mencionan algunos de los materiales empleados, a continuación se presenta un listado de todos ellos.

a) Aparatos y materiales.

Agitador circular, Lab-Line Jr. Mod. 3520

Agitador-incubador, Lab-Line Mod. 3595

Agitadores termo-magnéticos, Molde Lindberg

Autoclave y olla de presión

Balanza analítica, Sartorius Mod. 2432

Balanza granataria, Sartorius Mod. 1206

Bomba de vacío

Cajas Petri

Centrifugadora Beckman, Mod. J2-21

Contador bacteriológico de colonias Quebec

Copas de plástico de 10 ml.

Embudo de Buchner

Equipo bacteriológico

Incubadora

Kitasatos de 1000 ml.

Matraces Erlenmeyer, 500 y 250 ml.

Mezclador, Vortex Mod. 8223

Microscopio óptico Carl Zeiss

Papel Whatman Núm. 1

Pipetas de 1, 5 y 10 ml.

Potenciómetro Corning Mod. 5

Probetas de 50, 100, 250 y 1000 ml.

Recipientes de cartón; 40 cm., h y 35 cm,

Termómetro

Tubos de ensaye Núm. 9820

Vasos de precipitado, 100, 250 y 500 ml.

b) *Ingredientes y reactivos.*

Agar-agar

Acetona

Acido clorhídrico

Agua destilada

Alcohol

Bacto-peptona, triptosa o triptona

Carbonato de calcio

Cloruro de sodio

Cristal violeta

Dextrosa

Fosfato ácido disódico

Glucosa

Harina de soya

Hidróxido de sodio

*Ingredientes de la dieta Shorei modificada; tabla XI **.

Jugo de agave

Lactosa

Lugol

Miel de abeja

3.3. Metodología.

El estudio de B. thuringiensis GM-1 contra S. frugiperda, consistió de dos etapas fundamentales: la producción de extractos del complejo espora-cristal y las pruebas de toxicidad de esos extractos. La figura 2 esquematiza los principales pasos del trabajo; sin embargo, durante la segunda etapa, el proceso se amplió para incluir actividades de reproducción de S. frugiperda y evaluación del método de cría. A continuación se explican los procedimientos seguidos en cada fase del estudio.

3.3.1. Producción de los extractos.

Los pasos seguidos en la obtención de los extractos, fueron esencialmente tres: desarrollo del inóculo, fermentación de los medios estudiados y recuperación del complejo espora-cristal. Un diagrama de flujo de esta fase del estudio se muestra en la figura 3, la cual se explica -

*Infra, pág. 77.

Etapas del estudio

Pasos de cada etapa

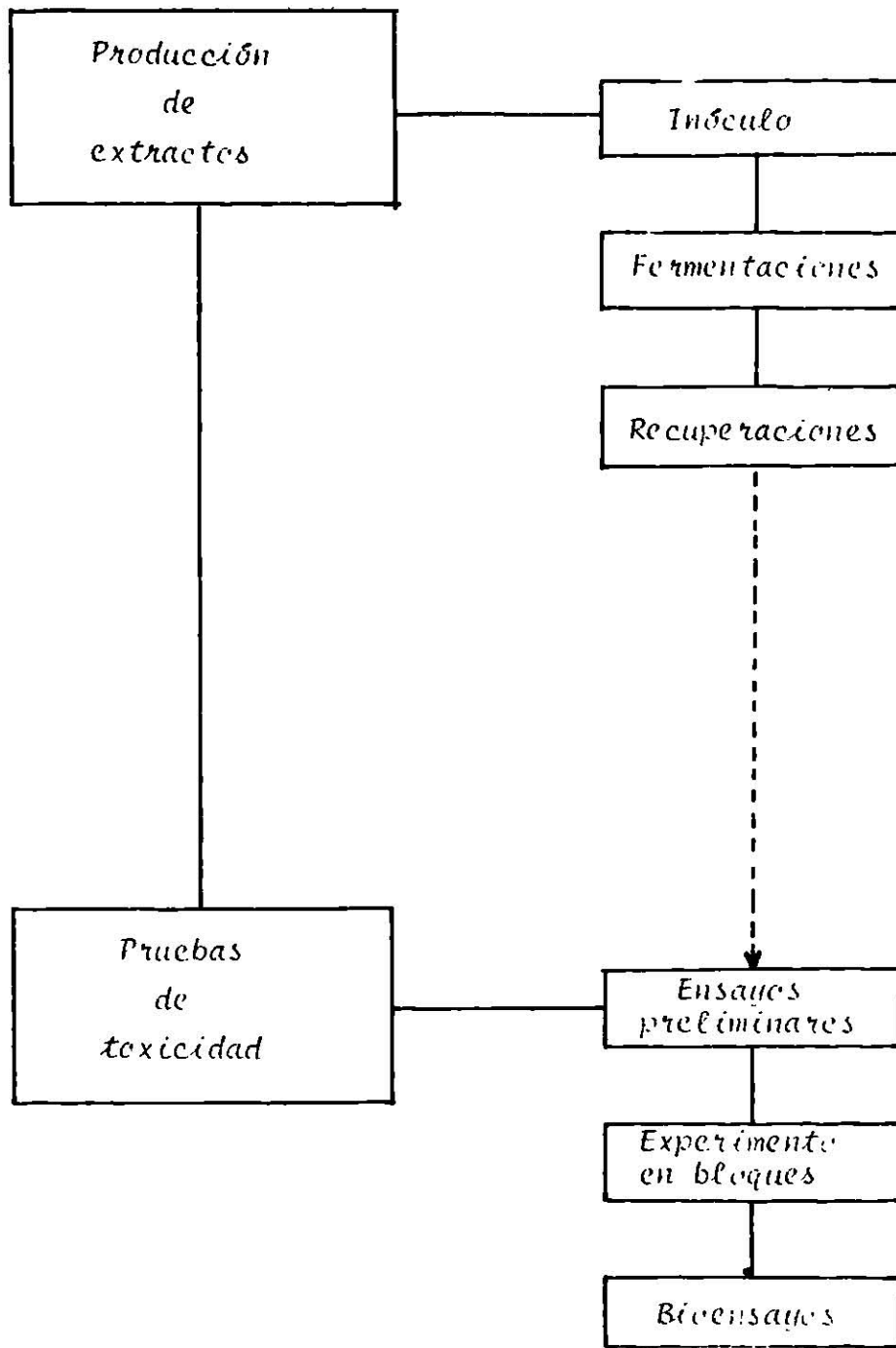


Figura 2. Diagrama de flujo de la metodología seguida en la producción de extractos y pruebas de toxicidad.

Etapas de la producción de extractos

Pasos por etapa

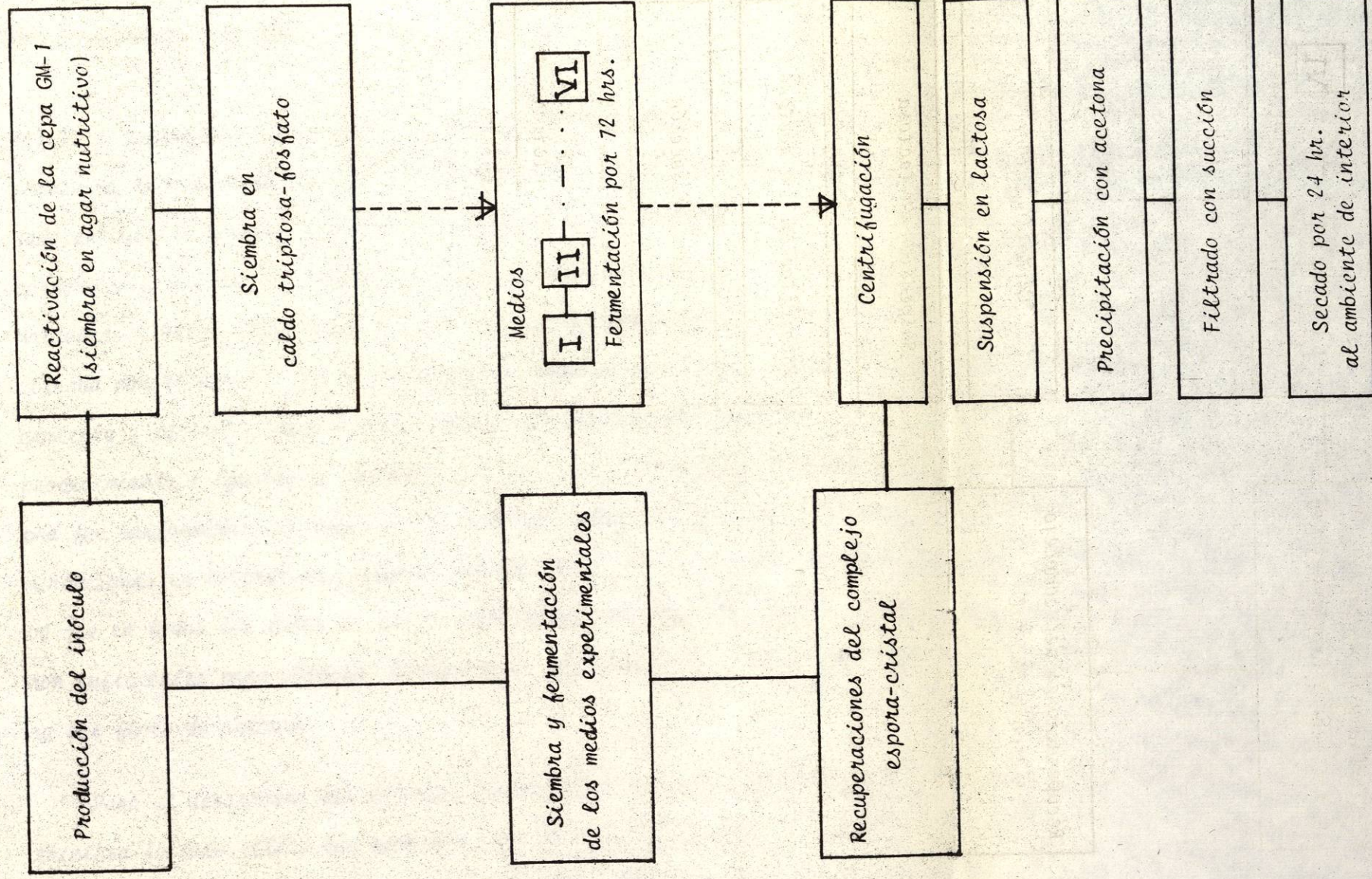


Figura 3. Diagrama de flujo seguido en la producción de extractos, con la cepa GM-1 de *B. thuringiensis* en seis medios de cultivo.

en el siguiente desglose.

3.3.1.1. **Desarrollo del inóculo.**- Este proceso se inició con la confirmación de la pureza de la cepa GM-1*, crecida sobre agar nutritivo inclinado en tubo de ensaye, mediante observación microscópica de un frotis; - corroborando además, las características morfológicas proporcionadas por Maldonado (1981). Para reactivar la cepa, se sembró en agar nutritivo inclinado por 24 horas a 32° C; al cumplirse este plazo se confirmó su crecimiento y pureza**, para posteriormente resembrarse utilizando el mismo procedimiento e iguales condiciones y medio. La finalidad de la resiembra fue uniformizar las fases de crecimiento vegetativo y aunque las recomendaciones en literatura, señalan también 24 hr. de incubación, se observó que en todos los casos en que se prepararon inóculos, 18 a 20 hr. fueron suficientes para obtener células en su fase vegetativa; apropiadas para los fines de siembra.

Para el desarrollo del inóculo, la bacteria se hizo crecer en caldo triptosa-fosfato (CTP); las composiciones de éste y el medio de agar nutritivo, se señalan en la tabla IX. Cincuenta mililitros de CTP, a prueba de esterilidad y en un matraz de 250 ml., fueron sembrados con una o dos asadas de la resiembra. El matraz inoculado se incubó por 15 a 18 hr. a 28° C y 180 a 200 r.p.m. en un agitador orbital. A pesar de que también en este caso se sugiere incubar 24 hr, se observó que el intervalo ante

*Proporcionada por J.L. Galán W. (Infra pág. 15)

**En lo sucesivo estará implícito que cada inicio y término de una siembra o proceso similar, tenga como actividad obligatoria la confirmación de crecimiento y/o pureza.

rior fue el mejor, para lograr una mayor proporción de células jóvenes, cuya reproducción era óptima para la inoculación de los medios experimentales.

Tabla IX. Medios para siembra y producción del inóculo. ^a

Nombre del medio	Sustrato	Concentraciones ^b
Agar nutritivo (AN)	Agar al 2%	20.0 g
	Agar-agar al 8%	8.0 g
Caldo triptosa	Triptosa	2.0%
fosfato (CTP)	Dextrosa o glucosa	0.2%
	Na ₂ HPO ₄	0.25%
	NaCl	0.5%

^aAjustados a pH 7.0 y esterilizados a 121° C y 6.81 Kg/cm² durante 15 - min.

^bEn 100 ml. de agua destilada.

3.3.1.2. Siembra y fermentación de los medios estudiados.- Para la fermentación de los medios investigados, se diseñó un experimento completamente al azar con seis tratamientos y cuatro repeticiones, para un total de veinticuatro unidades de observación. El rendimiento en gramos de peso seco de los extractos fue la única variable de estudio; aunque además, se tomaron datos sobre las variaciones de peso en los medios, para tratar de relacionarlas con sus rendimientos. Los tratamientos corresponden a los medios experimentales que se describen en la tabla X, en la --

que se indican sus componentes y la proporción usada de cada uno. Con excepción del medio I, utilizado como testigo, las concentraciones de jugo de agave se hicieron variar de 1 a 3%, en los medios II al IV y fue sustituido por dextrosa, en cantidades de 1.5 y 3.0 g/100 ml. de medio, en los números V y VI. La adición de CaCO_3 en estos dos últimos, fue para conferirles una acción amortiguadora, para las variaciones extremas de pH que se produjeran durante las primeras horas de fermentación, por tan elevadas cantidades de dextrosa. La fuente de nitrógeno, a base de harina de soya, se mantuvo constante en todos los medios con excepción del testigo, para estimar la influencia de las variaciones de la concentración de jugo de agave y dextrosa, sobre la esporulación y producción cristallífera de la cepa GM-1 en los distintos medios.

Tabla X. Composición de los medios experimentales. ^a

Sustratos	Número de medio					
	I	II	III	IV	V	VI
	Proporción de sus componentes ^b					
Harina de soya (g)	1.0	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Jugo de agave (ml)	1.0	1.0	1.5	3.0	-	-
Dextrosa (g)	-	-	-	-	1.5	3.0
CaCO_3 (g)	-	-	-	-	0.1	0.1

^a Ajustados a pH 7.0 y esterilizados a 121°C y 6.81 Kg/cm^2 durante 15 - min.

^b Por cada 100 ml. de agua destilada.

Los medios de estudio se prepararon con volúmenes de 100 ml. en matraces de 500; normalmente se corrieron dos medios y sus respectivos duplicados, cada siete u ocho días. Los medios, tras una prueba de esterilidad por 24 horas, fueron inoculados con un mililitro de cultivo puro de células vegetativas, desarrolladas en el CTP; para lo anterior, se utilizaron pipetas estériles de 1 ml. Los medios se fermentaron por 72 hr. a $32 \pm 2^\circ$ C, en un incubador-agitador Mod. 3595 y se oxigenaron con rotaciones de 250 a 300 r.p.m.. Durante este período, se hicieron observaciones cada 24 hr. para detectar contaminantes y observar el desarrollo celular.

3.3.1.3. Recuperación del complejo espora-cristal.- Cuando se estimó que la liberación de esporas y cristales en los medios era superior a 95%, se tomó nota de sus potenciales de hidrógeno finales y se ajustaron a 7.0. De inmediato se realizó la separación de sólidos, mediante centrifugación con 10,000 r.p.m. durante 15 minutos; la "pastilla" se suspendió en lactosa y precipitó con acetona; se filtró con vacío o succión y 2 a 4 lavados con acetona. Estos pasos constituyen el proceso básico del método de recuperación de cristales, propuesto por Dulmage, Correa y Martínez (1970) y que se conoce como "coprecipitación con lactosa".

3.3.2. Pruebas de toxicidad.

Como se mencionó inicialmente, en esta segunda etapa se incluyeron procedimientos para reproducir S. frugiperda y poder contar con poblaciones uniformes, saludables e identificadas, de larvas de esta especie, para las distintas pruebas de actividad.

3.3.2.1. Reproducción de Spodoptera frugiperda (Smith).- La producción de larvas de primer estadio, para realizar las pruebas de potencia de los extractos, se inició desde la colecta de huevecillos de "gusano cogollero" en el campo experimental de la Facultad de Agronomía, U.A.N.L.. - En la figura 4 se bosquejan los procedimientos centrales, realizados durante la reproducción de S. frugiperda; aunque en ella se señalan cinco funciones básicas, posteriores a la colecta de campo, en realidad pueden agruparse en dos pasos que comprenden actividades bien diferenciadas: la cría larvaria y el manejo de adultos. Acerca de éstas tratan los puntos siguientes.

3.3.2.1.1. Incubación y desarrollo larvario.- Las masas de huevecillos colectadas en malz de 20 días, fueron llevadas a condiciones de laboratorio para incubarlas. Se les proporcionó temperaturas de $27 \pm 2^\circ\text{C}$ y humedad relativa de $80 \pm 6\%$. Al eclosionar, las larvas de primer estadio fueron dispuestas, a razón de una o dos, en recipientes de plástico de 10ml con 3 a 5ml de la dieta de Shorei modificada (Tabla XI). El desarrollo larvario, que en promedio duró 13.4 días*, mudó 5 veces y presentó 6 estadios, estuvo bajo condiciones ligeramente distintas: $28 \pm 3^\circ\text{C}$, temperatura; y $50 \pm 10\%$, humedad relativa. La preparación de la dieta se llevó a cabo, de acuerdo con las medidas señaladas en la tabla XI y los pasos seguidos fueron fundamentalmente tres:

a) En 50% del total del agua destilada, según el volumen de dieta que se desee preparar, se agregó el agar-agar para disolverlo con temperaturas superiores a 80°C pero menores de 95.

* Datos sin publicar; Laboratorio de Cría Masiva, F.A.U.A.N.L.

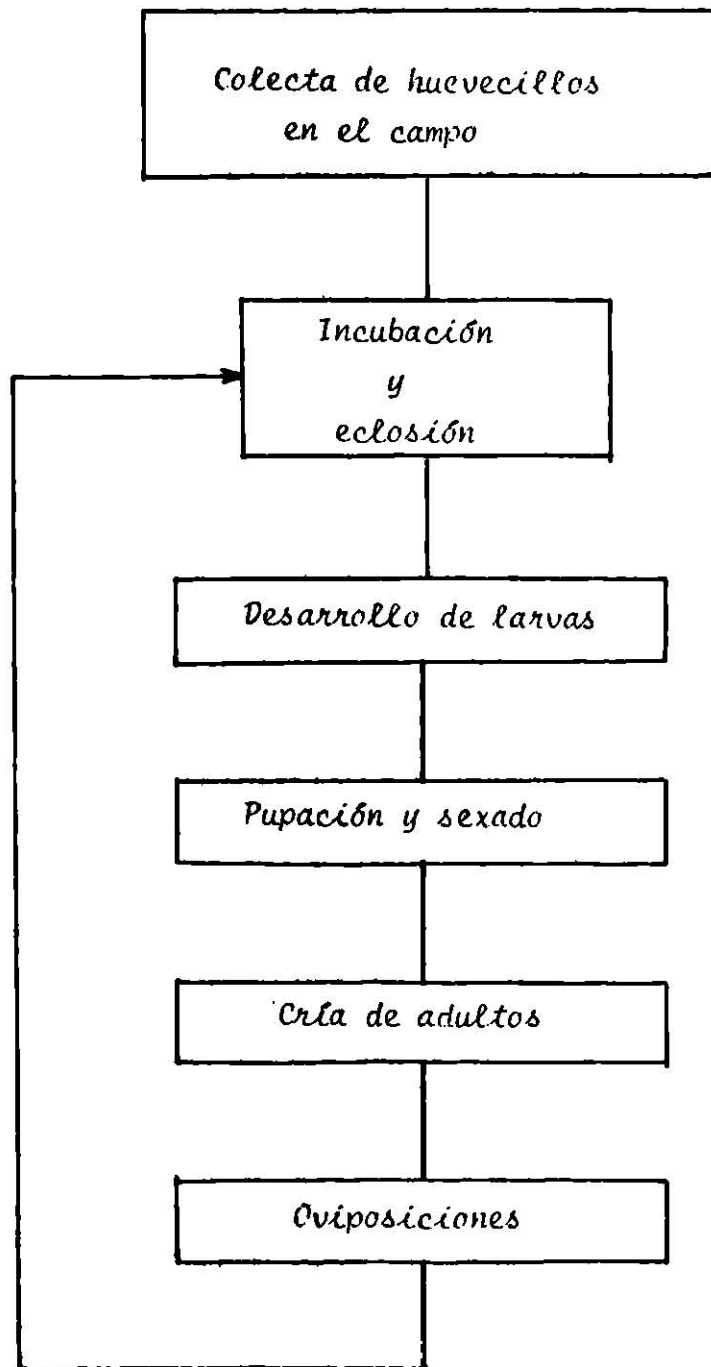


Figura 4. Diagrama de flujo seguido en la reproducción de S. frugiperda.

Tabla XI. Dieta de *Shorei* modificada, usada en la cría larvaria de *S. frugiperda*.^a

Ingrediente	Cantidad ^b
Agar-agar	34.8 g.
Harina de soya	241.8 g.
Germen de trigo	108.0 g.
Sal Wesson's	36.0 g.
Azúcar morena	43.8 g.
Parametilhidroxibenzoato	5.4 g.
Acido sórbico	3.24 g.
Acido ascórbico	14.4 g.
Auromicina	0.48 g.
KOH (22%)	18.0 ml.
Solución vitamínica ^c	12.0 ml.
Cloruro de colina (15%)	24.9 ml.
Formaldehído (10%)	15.0 ml.
Acido acético (25%)	39.9 ml.
Agua destilada	3000.0 ml.

^aFuente: Nuñez (1980).

^bConcentración suficiente para preparar 300 copas con 3 ml. cada una.

^cCompuesta por: Pantotenato de calcio, 12 mg; niacina, 6 mg; riboflavina, 3 mg; ácido fólico, 3 mg; tiamina HC 1, 1.5 mg; piridoxina HC 1, 1.5 mg; biotina, 0.12 mg; B 12, 0.006 mg; todos por cada ml. de agua.

- b) A la otra mitad del agua destilada, le fue disminuida la proporción que constituyen los materiales líquidos de la dieta. En este nuevo volumen de agua se agregaron todos los componentes de la dieta, incluyendo los líquidos con excepción de la solución vitamínica.
- c) La mezcla de los componentes se vertió en el agar disuelto y esta nueva mezcla se agitó por 5 a 10 minutos, hasta que su temperatura estuvo entre 55 y 60° C; intervalo en el cual se añadió el volumen indicado de solución vitamínica. La agitación continuó por 60 segundos más o el tiempo suficiente para un mezclado uniforme, cuidando que la temperatura no sobrepasara el umbral de 54° C.

3.3.2.1.2. Emergencia de adultos y oviposición.- Las pupas fueron sexadas y se dispusieron en una proporción de 3 hembras por 2 machos y un total de 25 palomillas por cámara de emergencia. Las condiciones ambientales en que se colocaron las pupas y los adultos, fueron idénticas a las señaladas para la incubación de los huevecillos. El período de pupación fue en promedio 5.3 días, mientras que los adultos vivieron 11.4*.

La dieta para las palomillas de S. frugiperda, consistió en una fuente sencilla de azúcares (miel de abeja) y solución vitamínica, disueltas en una proporción de 1:1:20 en agua destilada; es decir, 1 ml.

*Datos sin publicar; Laboratorio de Cría Masiva de Insectos, F.A.U.A.N.L.

de miel y 1 ml. de solución vitamínica por cada 20 ml. de agua destilada. A esta mezcla se le agregaron como conservadores 0.04 g. de parametilhidroxibenzoato y 0.1 g. de ácido ascórbico.

El número de huevecillos promedio por masa fue de 340 y se obtuvieron a los 3 ó 4 días después de emergidos los adultos; una segunda recuperación se hizo al séptimo día. Los huevecillos, cuyo período de incubación duró un promedio de 3.0 días, se colocaron en cajas petri bajo las condiciones señaladas anteriormente, para eclosión e inicio de un nuevo ciclo.

3.3.2.2. Ensayos preliminares.- La figura 5, muestra la relación que tuvo la reproducción de S. frugiperda, con las pruebas de toxicidad para B. thuringiensis GM-1. Los ensayos preliminares fueron el inicio de estas pruebas y se realizaron a partir de la segunda generación larval de laboratorio; el primero de ellos fue con cada uno de los extractos, utilizando la dosis de 500 μ g/ml. de dieta, fijada como máxima para detectar actividad, en todos los estudios con B. thuringiensis. Sin embargo, no todas las recuperaciones fueron probadas contra S. frugiperda; la primera mitad de las extracciones fueron enviadas a la ciudad de Brownsville, Tex., donde personal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, las ensayó contra T. ni y H. virescens con el fin de indagar algún indicio de patogenicidad de la cepa GM-1.

En todos estos ensayos preliminares, las observaciones se realizaron con lotes de 25 larvas de primer estadio, con excepción de S. frugiperda en la cual se emplearon grupos hasta de 50. En la tabla XX, de la sección de resultados, se resumen los porcentajes de mortalidad de las -

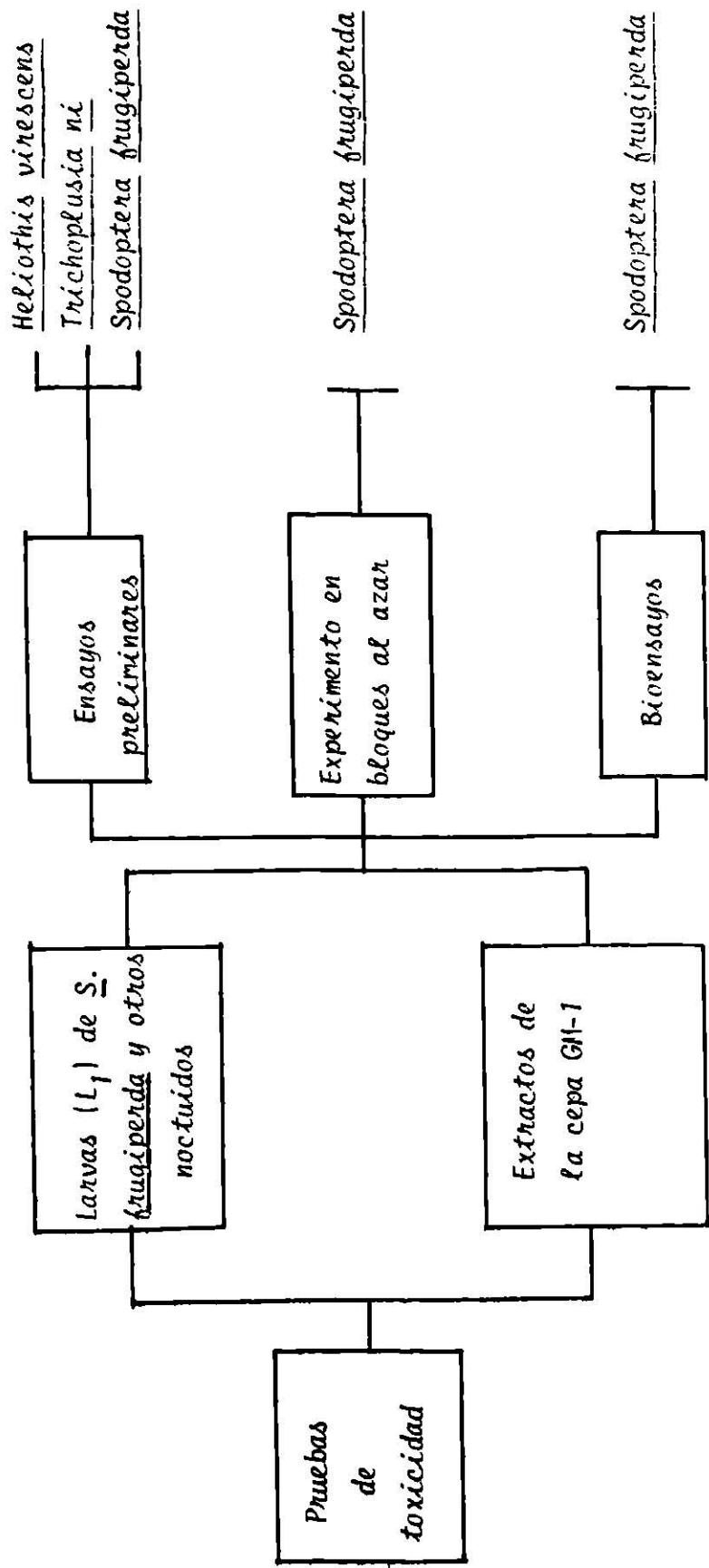


Figura 5. Diagrama de flujo de las pruebas de toxicidad con la cepa GM-1 de B. thuringiensis.

tres especies mencionadas para los distintos extractos.

3.3.2.3. Experimento con un diseño de bloques al azar.- Este estudio se realizó únicamente con S. frugiperda y sus objetivos fueron: determinar estadísticamente la actividad en los extractos en los medios -- eficientes, para producir esporas y cristales, y detectar mediante el bloqueo los distintos grados de susceptibilidad en esta especie. Los antecedentes del experimento fueron:

Número de tratamientos: seis. Cuatro extractos de la cepa GM-1 obtenidos de los medios I, II, III y IV; el estándar internacional -- HD-1-S-1971 y un testigo en blanco. Dosis única: 500 μ g/ml de dieta .

Número de repeticiones o bloques: seis; cada uno con un determinado grupo de larvas, proveniente de una misma masa de huevecillos.

Tamaño de la unidad experimental: quince larvas de primer estadio. Variables de estudio: % mortalidad y peso larval.

Total de unidades experimentales: treinta y seis.

Diseño: bloques completamente al azar; cuyo modelo estadístico es $V_{ij} = \mu + T_i + B_j + E_{ij}$, donde:

V_{ij} es la observación del tratamiento i en el bloque j .

T_i es el efecto del tratamiento i ; positivo en tratamientos con valores superiores a la media, y negativo para aquéllos menores.

B_j es el efecto del bloque j ; también con valores positivos y negativos. (μ es un efecto de la media general).

E_{ij} es un error aleatorio, que surge por el efecto de todos los factores no controlados en el diseño y que causan heterogeneidad en da

tos observados.

3.3.2.4. Bioensayos.- Como originalmente se había proyectado, el estudio prosiguió hasta su consecución y los bioensayos se realizaron con la finalidad de explorar, cualquier posibilidad de aumento en la actividad de la cepa GM-1 contra S. frugiperda, al incrementar la dosis sobre el umbral de 500 μ g. Se realizaron dos bioensayos utilizando una mezcla de los materiales remanentes, de los extractos II, III y IV, contra el estándar internacional HD-1-S-71. De ambas formulaciones se probaron cinco dosis: 500, 1000, 1250 y 2000 μ g/ml. de dieta, en lotes con 25 larvas de primer estadio. Para obtener las distintas concentraciones, se adoptó el patrón de diluciones propuesto por Dulmage et al., (1971). Este método consiste en un procedimiento que inicia con la preparación de una solución tope, convencionalmente la mayor concentración que se desee probar, usando una cantidad de extracto y volumen de solvente según las diluciones que se requieran. De esta solución madre, compuesto en una relación 1:1, se toman dos alícuotas previamente calculadas, para obtener -- las diluciones 3:4 y 1:2 al mezclarse en el solvente usado. El resto de las alícuotas se toman de estas últimas diluciones y las posteriores, siguiendo el patrón 3:8, 1:4, 3:16, 1:8.

3.4. Recolección de datos.

El esquema de la figura 6 muestra el orden de la toma de datos, que se siguió durante los avances del estudio. Como se puede apreciar, a excepción de las observaciones de crecimiento, esporulación y formación de cristales, el resto de los datos son cuantitativos, lo que permitió ha--

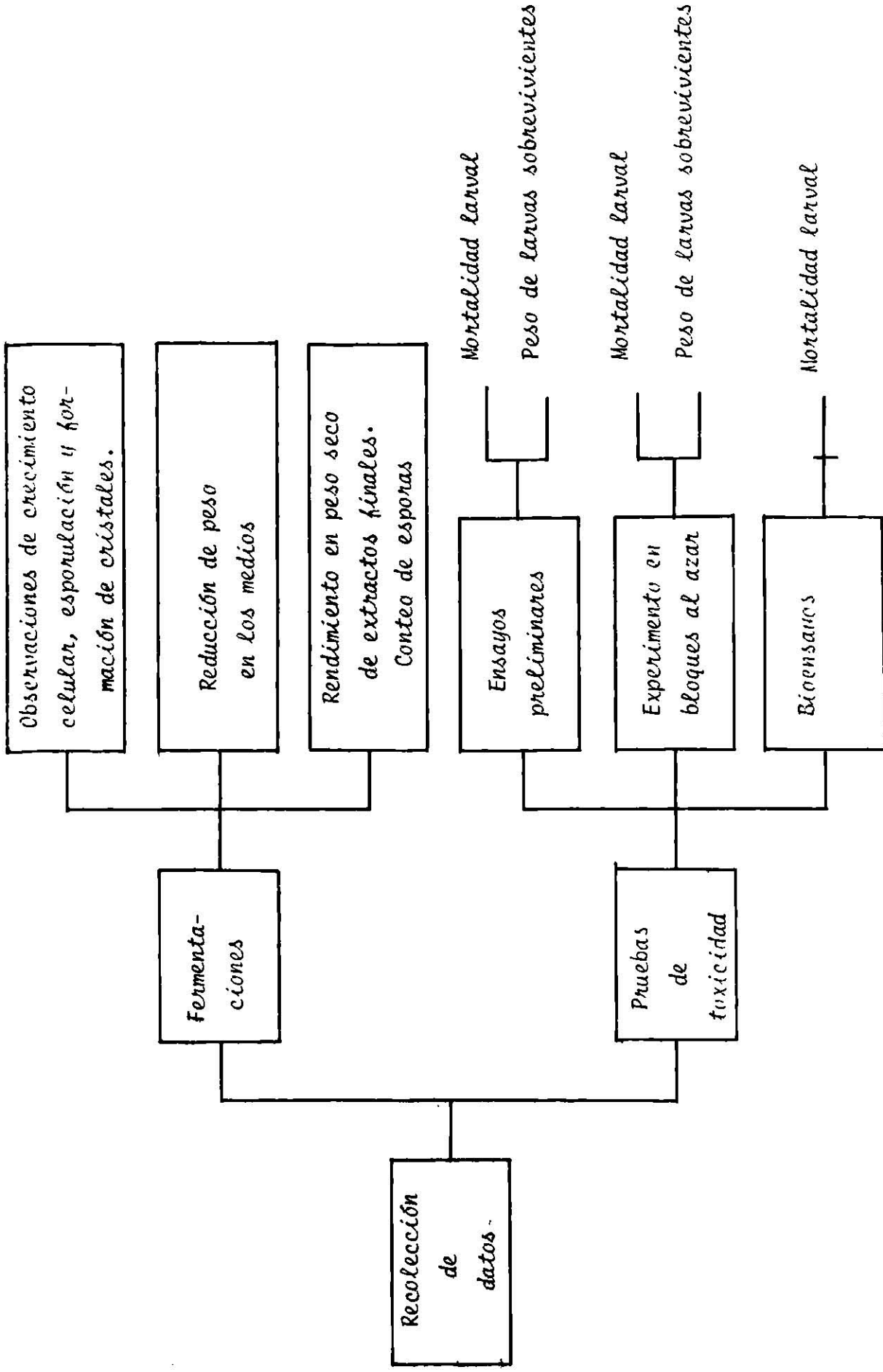


Figura 6. Datos registrados durante las fermentaciones de los medios y las pruebas de toxicidad de *B. thuringiensis* GM-1 en *S. frugiperda*.

cer análisis estadísticos de los resultados. Durante las fermentaciones para producir los extractos, además de las anotaciones cualitativas mencionadas, se registraron las reducciones de peso en los medios durante la fermentación anotando el peso inicial y final de cada medio y el rendimiento en peso seco de los extractos finales.

Durante las pruebas de potencia, se tomaron datos de porcentaje de de larvas muertas, después de haberse colocado en dieta inoculada con distintas dosis del complejo spora-cristal, durante siete días; tanto en las pruebas preliminares, como en el experimento en bloques y los bioensayos. Otra variable de estudio fue considerada en los ensayos y el experimento en bloques: el peso de las larvas sobrevivientes. Este dato se registró obteniendo el peso promedio del número de larvas que mostraron movimiento, en cada unidad experimental después de los mismos siete días.

3.5. Evaluaciones.

El diagrama de flujo de la figura 7 presenta los métodos utilizados para la evaluación de los resultados obtenidos. A continuación se desglosan las estimaciones aritméticas y estadísticas a que hace referencia tal esquema y en el orden cronológico del estudio.

3.5.1. Evaluación de las fermentaciones.

Para evaluar el comportamiento de las fermentaciones en los distintos medios de cultivo, se analizaron dos variables aleatorias:

a) Rendimiento en peso seco de los extractos finales.

Para determinar si todos los medios tuvieron el mismo rendimiento, se realizó un análisis de varianza, considerando un experimento completamente al azar con el número de tratamientos igual al número de medios experimentales y cuatro repeticiones. La hipótesis a probar fue:

H_0 : No existe alguna diferencia en los efectos por tratamiento.

H_a : Al menos alguno de los medios es diferente al resto.

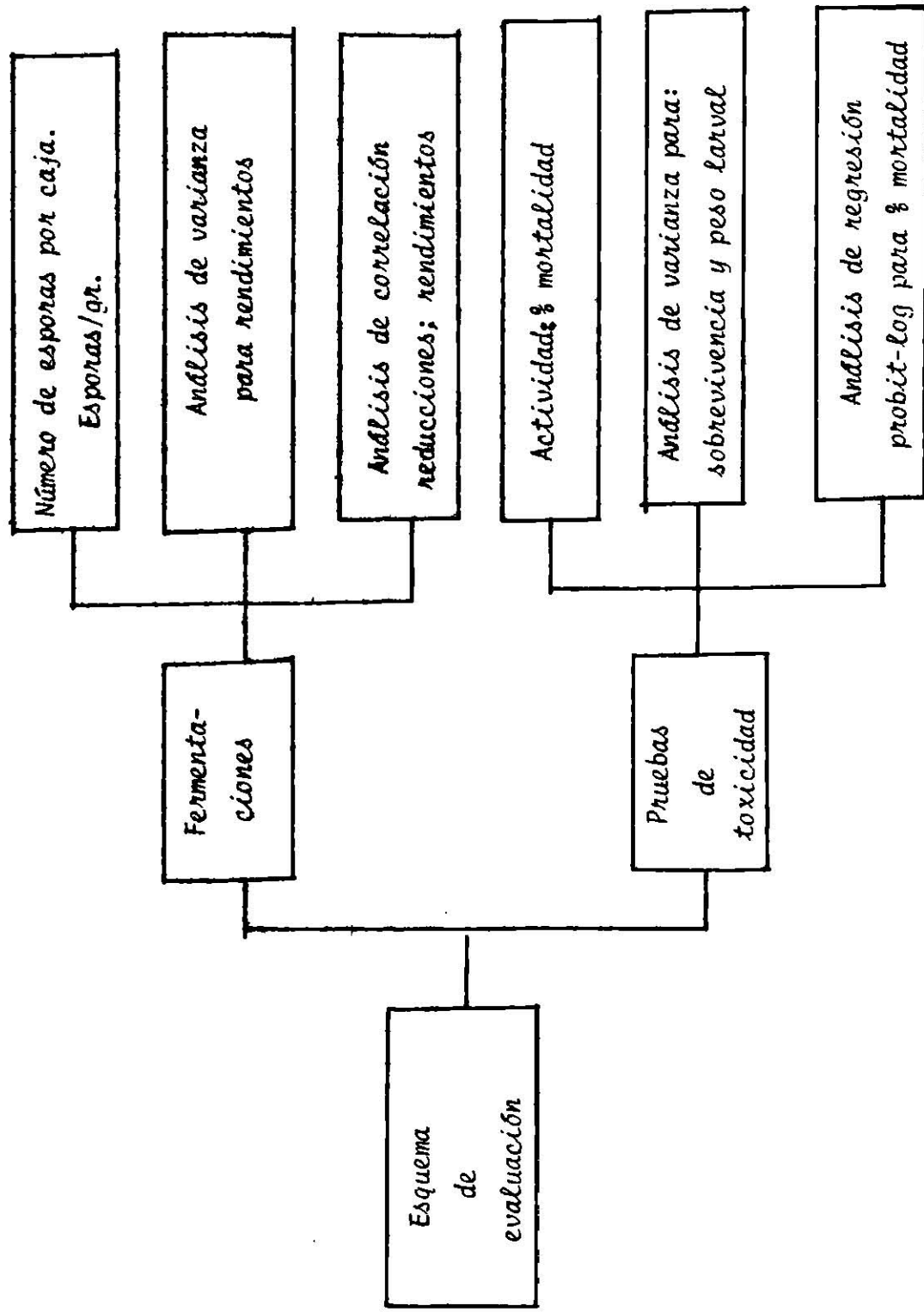


Figura 7. Evaluaciones de los datos obtenidos en las fermentaciones y las pruebas de toxicidad.

b) Porcentaje de reducción del peso de los medios.

Los datos observados en esta variable se agruparon con los de rendimiento y se realizó un análisis de correlación para determinar si estas variables muestran dependencia, para así poder inferir el comportamiento de una fermentación con respecto a su rendimiento; la hipótesis a probar fue:

$$P = 0 \quad \text{vs} \quad P \neq 0$$

3.5.2. Evaluación de la toxicidad de los extractos.

Durante las pruebas de toxicidad de los extractos de B. thuringiensis GM-1, se siguieron varios mecanismos. Para indicar cuáles fueron los métodos de análisis empleados durante esta fase, se presenta -- continuación un resumen de las evaluaciones, encabezando cada punto -- con el enunciado del método, a diferencia de la descripción analítica sobre las fermentaciones, en la que cada evaluación se intituló con la variable estudiada.

a) Pruebas de actividad.

Para determinar la actividad de los extractos se registraron las proporciones de larvas muertas durante los ensayos preliminares, utilizando 500 μ g/ml de dieta, en lotes de 25 larvas. La actividad se estudió en Heliothis virescens y Trichoplusia ni, además de Spodoptera frugiperda.

b) Experimento en bloques al azar.

Para establecer si los extractos provenientes de distintos medios, poseían la misma actividad, se realizaron dos análisis de varianza: uno para el número de larvas sobrevivientes y el otro para su peso promedio,

utilizando un diseño en bloques al azar, con cinco tratamientos y seis repeticiones. Las hipótesis probadas para ambas variables fueron:

Ho: Todos los efectos por tratamiento son estadísticamente iguales.

Ha: Al menos alguno de los efectos por tratamiento es diferente a los restantes.

Y la hipótesis probada sobre la susceptibilidad de S. frugiperda a B. thuringiensis fue:

Ho: Ningún grupo larval mostrará diferencias en susceptibilidad.

Ha: Al menos uno de los grupos de larvas mostrará una susceptibilidad diferente.

c) Análisis "probit".

Para determinar la potencia de los extractos se analizaron en unidades "probit", los resultados de porcentajes de mortalidad en larvas (L₁) de S. frugiperda en respuesta a cinco dosis tanto de los extractos, como del estándar internacional HD-1-S-1971. Se calculó la concentración letal media y se transformaron los resultados a unidades internacionales.

RESULTADOS Y DISCUSION

Siguiendo el orden establecido en la sección de materiales y métodos, a continuación se presentan los resultados obtenidos durante el estudio, agregando para cada caso su análisis estadístico, gráficas y discusión que expliquen su comportamiento.

4.1. Fermentaciones.

De los medios experimentales citados en la tabla X*, los números V y VI que contuvieron dextrosa, como fuente de carbono, no produjeron cristales, ni esporularon convenientemente y mostraron un crecimiento celular anormal, en comparación con los medios a base de jugo de agave que si originaron esporas y cristales. En la mayoría de los casos los cristales fueron notorios en los medios con jugo de agave, desde las 48 horas después de iniciada la fermentación. La tabla XII describe las características morfológicas observadas en las células, producidas en los dos grupos de medios.

Se puede explicar que el atrofiamiento, en el desarrollo de las células obtenidas en medios con dextrosa, no es realmente anormal si se considera que pudo haberse originado por una inadecuada proporción en la fuente de nitrógeno, ya que para ambas concentraciones de dextrosa, 1.5 y 3.0%, se utilizó tan sólo 1.5% de harina de soya como única fuente de nitrógeno. Algunos reportes bibliográficos apoyan lo anterior; por ejemplo, Megna, citado por Dulmage y Rhodes (1971), estableció que cualquier desbalance en el suplemento de nitrógeno y carbohidratos, resulta en una incompleta esporulación, fractura celular, germinación de esporas y/o au

*Supra, pág. 73.

Tabla XII. Morfología observada en células de *B. thuringiensis* GM-1, desarrolladas en dos tipos de medios.

Variación de la fuente de carbono		
Tiempo de observación	Jugo de agave	Dextrosa
A las 24 horas	Células jóvenes, elíptico-elongadas, con esporas o aún no esporuladas. La mayoría -- dispuestas en pares.	Células jóvenes, elíptico-elongadas; presentando varias regiones cristalinas (no teñidas).
A las 48 horas	Más de un 80% de las células hablan liberado su espora y su cristal. La espora, no tiene forma elongada, con una longitud de casi 3 veces su ancho. Muestran los cristales teñidos, muestran una dimensión de "mediano" a "grande", casi el doble de la espora.	Células aparentemente aún jóvenes, no lisadas; algunas presentan una región no teñida, posiblemente se pudo haber tratado de la espora; aunque por lo general, muchas presentaron dos o más áreas no teñidas. No se observan ni esporas ni cristales libres.
A las 72 horas	Más de un 95% de las células hablan liberado sus esporas y cristales.	Algunas células lograron esporular, pero no se observó liberación de esporas ni cristales.

tólisis.

Estas tres últimas observaciones de Megna, fueron confirmadas en el presente estudio, en cuatro de los medios con dextrosa, cuya fermentación se continuó hasta 120 horas. En estos medios se encontró que a las 96 horas se produjo una nueva generación de células, pudiéndose notar también germinación esporal. Estas nuevas células al ser teñidas con cristal violeta, no presentaron las características morfológicas de las descritas a las 48 horas y fueron semejantes a las producidas en jugo de agave, aunque su número fue muy reducido. A las 120 horas se pudo notar una gran cantidad de fragmentos celulares, ocasionales esporas libres y cuerpos teñidos amorfos.

Scherrer, Luthy & Trumpi (1972) encontraron que concentraciones de glucosa superiores a 0.8%, originaron la formación de cuerpos paraesporales que perdían su forma que inhibieron el crecimiento, reiniciado sólo cuando se agregó hidróxido de sodio. Estos resultados también explican gran parte de los obtenidos en el estudio; siendo extremadamente importantes los cuerpos amorfos, que pudieron haberse originado a las 48 horas sin haber sido advertidos y las regiones sin teñir, análogas a los gránulos de Scherrer y colaboradores.

Una explicación física de lo que pudo haber ocurrido en los medios con dextrosa, fue que la elevada concentración, sobre todo el medio VI con 3%, ejerció una elevada presión osmótica sobre las células vegetativas, lisándolas.

4.1.1. Análisis estadístico de los rendimientos en peso seco de extractos finales, obtenidos en los medios a base de jugo de agave.

Así, habiendo obtenido resultados positivos para la producción de cristales, tan sólo en los medios a base de jugo de agave, en la tabla XIII se presentan los datos observados en los medios I al IV; los números II, III y IV fueron las fermentaciones, en que se trató de determinar la influencia de diferentes concentraciones de jugo de agave, mientras que la I se utilizó como testigo y se trata de un medio similar al que Maldonado (1981), encontró con una aceptable producción de cristales con la cepa GM-1 de B. thuringiensis.

Tabla XIII. Peso seco de los extractos producidos por la cepa GM-1 de B. thuringiensis, en cuatro medios a base de jugo de agave y harina de soya.^a

Medios de Cultivo	R e p e t i c i o n e s				\bar{y}_i	DMS*
	1	2	3	4		
I	0.3117	0.3257	0.4813	0.4099	0.3822	a
II	0.6654	0.6943	0.6920	0.6503	0.6755	b
III	0.6739	0.6820	0.6080	0.7529	0.6792	b
IV	0.8055	0.7988	0.8550	0.7750	0.8086	c

^aSe incluye prueba de medias.

*Al nivel de significancia del 5%, las literales diferentes señalan medias distintas.

El análisis de varianza de estas observaciones en la tabla XIV, muestra que existió una alta significancia en los efectos por tratamiento, por lo que se rechazó la hipótesis nula de igualdad de medias y se aceptó la alternativa de efectos diferentes. Esto se explica fácilmente con la prueba de medias de la tabla XIII, en la que se aprecia que todos los medios fueron superiores al testigo, en una proporción promedio de casi el doble de su peso. Cabe señalar, sin embargo, que la harina de soya fue la responsable indiscutible de esta drástica diferencia, pues ésta se advierte desde el medio II, con 1% de jugo de agave, igual al medio I; mientras que la harina de soya fue de 1.5 y 1.0% respectivamente, lo que al parecer originó una mayor acumulación de sólidos en el medio II, dando lugar a extractos más pesados, como se puede observar en la misma tabla XIII.

Tabla XIV. Análisis de varianza de los rendimientos, en peso seco de extractos finales, obtenidos con la cepa GM-1 en los medios a base de jugo de agave y harina de soya.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F _{Calc.}	F _{Tab.}	
					5%	1%
Tratamientos	3	0.3906	0.1302	4.65**	3.49	5.95
Error	12	0.0341	0.0028			
Total	15	0.4247				

**Diferencia altamente significativa.

C.V. = 0.083

Lo anterior se confirmó parcialmente durante el conteo de esporas que se presenta en la tabla XV, en el que se encontró que los medios I y II produjeron cantidades similares de esporas, estimadas como colonias por caja, tras una dilución de 10^{-6} .

Tabla XV. Conteo de esporas de los extractos finales, producidos en los medios a base de jugo de agave y harina de soya por la cepa GM-1 de *B. thuringiensis*.

Medios	F e r m e n t a c i o n e s				Promedios (colonias/caja)	Esporas/ gramo
	1	2	3	4		
I	**	1	4	*	2.5×10^6	5×10^7
II	1	3	2	*	2.0×10^6	4×10^7
III	**	2	3	7	4.0×10^6	8.0×10^7
IV	3	*	6	9	6.0×10^6	12.0×10^7

*Contaminación. **Material insuficiente.

Por otra parte, de acuerdo con la prueba de medias de la misma tabla XIII, los medios II y III fueron iguales; mientras que el IV logró un rendimiento medio suficiente para diferir de todos los demás, resultando ser el mejor nivel de jugo de agave, para la producción de extractos del complejo espora-cristal, medidos en peso seco. Esto fue apoyado por el conteo de esporas de la tabla XV, en el que se observa que el número de éstas se incrementó, a medida que se aumentó la fuente de carbono en los medios II al IV, con 1.0, 1.5 y 3.0% de jugo de agave. No obstante, toda conclusión hasta aquí se relaciona con un só-

lo aspecto de la cepa GM-1, el de la producción de extractos; de los que, independientemente de su peso, es más importante su actividad --- tóxica contra insectos. Esto es necesario aclararlo, puesto que la -- producción de proteína cristalífera en B. thuringiensis, no siempre es tá correlacionada con su toxicidad (Scherrer, Luthy y Trumpf; 1973).

4.1.2. Análisis de las reducciones en los pesos de los medios durante su fermentación.

En la tabla XVI se muestran los datos observados en la variación de peso de los medios, en relación con sus rendimientos. En ese resu men se puede notar que en todos los casos, tomando por separado cada fecha de fermentación, los medios en los que se registró mayor reduc ción de su peso, originaron extractos más pesados. Este hecho, diffl cil de interpretar, puede tener varios significados; sin embargo, es muy posible que se haya debido a una actividad metabólica diferencial, consumiéndose más cantidad de sólidos en los medios con mayor reduc ción en su peso. No fue posible realizar un análisis de correlación entre estas observaciones, debido a que las variaciones entre reduc ciones y rendimientos no fueron proporcionales en distintas fechas; - Esto ocurrió en todos los casos, v.gr. en el medio II, fermentación 1 el duplicado redujo su peso 1.6 g. y rindió un extracto de 0.6943 g., mientras que en la fermentación 2, el medio principal disminuyó - 0.6 g., de su peso inicial y produjo 0.6920 g. de extracto, cantidad casi idéntica a la anterior con una reducción más de dos veces 0.6. A pesar de todo, si fue factible un análisis de correlación de los re--

Tabla XVI. Relación entre la reducción del peso en los medios experimentales y su rendimiento, en peso seco de sus extractos, tras desarrollarse en ellos la cepa GM-1 de B. thuringiensis.

Fermentaciones	Fechas ()	M e d i o s							
		I	II	III	IV				
Gramos de:									
		Reducc.	Rto.	Reducc.	Rto.	Reducc.	Rto.	Reducc.	Rto.
Original	(1)	0.6	0.3117	0.9	0.6654	0.4	0.6739	0.6	0.8055
Duplicado		1.3	0.3257	1.6	0.6943	0.6	0.6820	0.4	0.7988
Original	(2)	0.5	0.4813	0.6	0.6920	0.9	0.6080	0.7	0.8550
Duplicado		0.4	0.4099	0.4	0.6503	1.4	0.7529	0.5	0.7750
X		0.7	0.3822	0.875	0.6755	0.825	0.6792	0.55	0.8086

sultados promedio, por cada medio de cultivo, expresados en porcentajes de la forma que se muestra en la tabla XVII, manejando el % de reducción como variable "X" y el % de rendimiento como "Y".

Tabla XVII. Promedios de las reducciones de peso por medio y sus rendimientos, transformados a porcentajes.

Medios	Reducciones		Rendimientos	
	Promedio (g)	Porcentaje* X_i	Promedio (g)	Porcentaje** Y_i
II	0.875	43.8	0.6755	67.6
III	0.825	41.3	0.6792	67.9
IV	0.55	27.5	0.8086	80.9

*Se calculó considerando una escala arbitraria de 0 a 2 g., suponiendo que 2 sería la reducción máxima esperada, es decir $2 = 100\%$.

**Se consideró una escala de 0 a 1 g., con un gramo como 100% de rendimiento máximo esperado.

El análisis de correlación se llevó a cabo con los resultados de los medios II al IV, ya que fueron éstos en los que se hizo variar la concentración de jugo de agave, manteniendo la misma cantidad de harina de soya, 1.5%. El estimador "r" del coeficiente de correlación "p". se calculó mediante la ecuación:

$$r = \frac{\sum y_i X_i - \frac{(\sum y_i)(\sum X_i)}{n}}{\sqrt{\left[\sum y_i^2 - \frac{(\sum y_i)^2}{n} \right] \left[\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n} \right]}}$$

La prueba de hipótesis de $H_0: \rho = 0$ contra $H_a: \rho \neq 0$, se hizo con el estadístico:

$$t_c = \frac{r \sqrt{n-2}}{\sqrt{1-r^2}}$$

el resultado que originó este análisis fue:

$$r = -0.99234 \quad \text{y} \quad t_c = 8.081$$

Como el valor absoluto de "t" calculada fue menor que el de "t" tabulada, al nivel de significancia de $P = 0.05$, ya que $t(0.05/2, n-2) = t(0.025, 1) = 12.706$, se aceptó la hipótesis nula de $\rho = 0$ y se concluyó que no existió relación significativa, entre las variables rendimiento y reducción de peso en los medios. No obstante, es importante señalar que al nivel de significancia de $P = 0.1$, hubo cierto grado de correlación puesto que $t(0.05, 1) = 6.314$, aunque la probabilidad de error es en este caso de 10%. Si lo anterior es cierto, los medios se comportaron de la siguiente forma: el substrato consumido fue reemplazado por la acumulación de nuevo material celular sintetizado, en respuesta a mayores concentraciones en la fuente de carbono. Existen pocas bases para tal hipótesis, salvo el conteo de esporas*, así como el incremento en proteína cristalífera logrado por Scherrer, Luthy y Trumpi (1973), con el serovar *1-thuringiensis* en distintas concentraciones de glucosa. Aunque, por otro lado, esta hipótesis y los resultados obtenidos en el presente estudio, incluyendo la prueba de

*Supra: Pág. 93. Tabla XV.

medias de los extractos finales*, son opuestos a los observados por Mur- (1983) en la primera de sus conclusiones, en que afirmó que la variación de las concentraciones de jugo de agave, no modificó el peso seco de los extractos, ni el conteo de esporas de la cepa GM-2.

La figura 8 muestra el histograma de los porcentajes de reducción y rendimiento de los medios, para ilustrar la supuesta correlación entre estas variables; en él se observa claramente que el medio IV, con el rendimiento más alto, 80.9%; disminuyó moderadamente su peso, 55.0%; - - mientras que el medio I, con el rendimiento más pobre, 38.2%; tuvo una - reducción promedio en el peso de sus fermentaciones de 35%, casi igual - al porcentaje de su rendimiento. El medio IV incrementó ligeramente su - producción con respecto al III y redujo más el peso de sus caldos que és - te.

4.2. Pruebas de toxicidad.

Secuencialmente los resultados de las pruebas de toxicidad son tratados a continuación, de acuerdo con el orden establecido en la metodología.

4.2.1. Ensayos preliminares.

La tabla XVIII presenta los resultados de mortalidad originada por las extracciones, contra tres especies de lepidópteros. En estos términos, se observa que la cepa GM-1 fue inactiva para todos los medios y - sus fermentaciones; sin embargo, los medios I, II y III fueron unifer- - mes en su "actividad" y algo superiores al IV, como se puede apreciar

* Supra, pág. 91. Tabla XIII.

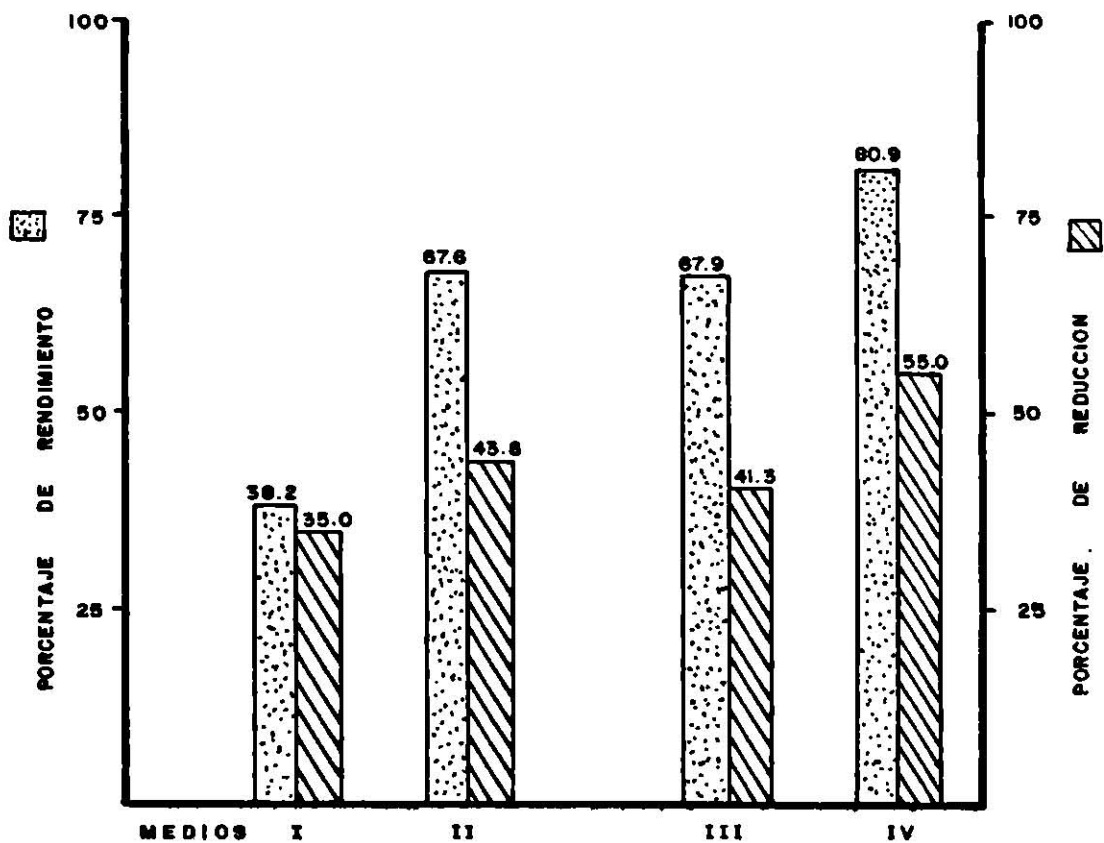


Figura 8. Relación entre los porcentajes de rendimiento, en peso seco de los extractos finales, y reducción del peso de los medios de jugo de agave y harina de soya. [Histograma]

Tabla XVIII. Porcentajes de mortalidad obtenidos durante los ensayos preliminares, entre especies Lepidópteras, con los extractos de la cepa GM-1 de B. thuringiensis, crecida en medios con jugo de agave y harina de soya.

Extractos* de cuatro fermentaciones

Medios	n_1^{**}	n_2^{**}	n_3	n_4		
E s p e c i e s (% mortalidad larval)						
	<u>T. ni</u>	<u>H. virescens</u>	<u>T. ni</u>	<u>H. virescens</u>	<u>S. frugiperda</u>	<u>S. frugiperda</u>
I	8	m.i.	0	4	25.5	18.3
II	100***	84	16	8	29.5	14.7
III	100***	m.i.	16	m.i.	24.4	17.9
IV	0	88	4	8	10.7	8.1

*Dosis usada: 500 µg/ml. de dieta, en grupos de 25 o más larvas.

**Probados en Brownsville, Tex., EE.UU.

m.i. = Material insuficiente.

***Probable error humano, como lo confirman los resultados de la fermentación 2, con 16 y 8 % de mortalidad larval.

en las fermentaciones 3 y 4. Aunque estas observaciones no son confiables debido a el error humano y la ausencia de análisis estadístico, - los datos de la tabla XIX, sobre el porcentaje de reducción del peso - de las larvas de S. frugiperda, confirman que la cepa GM-1 si posee -- cierta actividad, pues por ejemplo, los extractos de los medios I y II redujeron hasta en un 73.5 y 85.6%, respectivamente, el peso de las -- larvas con relación a las del testigo en blanco. Esta influencia nega tiva en el desarrollo de las larvas de S. frugiperda, producido por la GM-1, fue casi similar a la ejercida por el extracto de la HD-1 variedad kurstaki, usada en las formulaciones comerciales de B. thuringien- sis.

Tabla XIX. Reducción del peso en larvas de S. frugiperda, observada - durante el ensayo preliminar de los extractos recuperados en las fer- - mentación tres, de la cepa GM-1*.

Medios F.3	Número de larvas	Mortalidad (%)	Peso promedio (mg)	Reducción del peso (%)
I	47	25.5	6.071	73.5
II	44	29.5	3.309	85.6
III	45	24.4	7.724	66.3
IV	55	10.7	9.971	56.5
HD-1**	33	18.1	2.996	86.9
Testigo	49	0.0	22.942	0.0

*Dosis: 500 g/ml. de dieta.

**Extracto del estándar internacional HD-1-S-71.

Tabla XX. Resultados del experimento realizado bajo un diseño de bloques al azar, para determinar estadísticamente la actividad de B. thuringiensis GM-1 en larvas de primer estadio de S. frugiperda.

Bloques		T r a t a m i e n t o s					
VI	M =	T _{3,6} 6.66%	T _{2,6} 13.33%	T _{6,6} 6.66%	T _{1,6} 0%	T _{4,6} 0%	T _{5,6} 57.14%
	p =	11.492 mg	0.669 mg	49.95 mg	2.06 mg	6.927 mg	1.117 mg
IV	M =	T _{1,4} 6.66%	T _{4,4} 0%	T _{3,4} 0%	T _{6,4} 6.66%	T _{5,4} 93.33%	T _{2,4} 13.33%
	p =						
III	M =	T _{5,3} 40%	T _{1,3} 6.66%	T _{4,3} 13.33%	T _{2,3} 6.66%	T _{6,3} 0%	T _{3,3} 6.66%
	p =	1.5 mg	2.671 mg	6.923 mg	1.257 mg	36.662 mg	7.238 mg
V	M =	T _{4,5} 6.66%	T _{3,5} 0%	T _{2,5} 20%	T _{5,5} 26.66%	T _{1,5} 6.66%	T _{6,5} 6.66%
	p =	9.136 mg	10.733 mg	1.083 mg	0.827 mg	2.079 mg	44.736 mg
I	M =	T _{2,1} 6.66%	T _{6,1} 0%	T _{5,1} 73.33%	T _{4,1} 40%	T _{3,1} 33.33%	T _{1,1} 20
	p =	0.378 mg	31.343 mg	0.225 mg	1.044 mg	1.278 mg	0.75 mg
II	M =	T _{6,2} 0%	T _{5,2} 20%	T _{1,2} 0%	T _{3,2} 0%	T _{2,2} 0%	T _{4,2} 0%
	p =	44.114 mg	3.591 mg	4.147 mg	11.32 mg	3.813 mg	7.86 mg

4.2.2. Análisis de los resultados del experimento en bloques al azar.

En la tabla XX se expresan los porcentajes de mortalidad larval en S. frugiperda, como respuesta a una dosis de 500 μ g/ml. de dieta, de extractos del complejo espora-cristal producidos por las cepas - - GM-1 y HD-1 de B. thuringiensis. También se presentan los resultados relativos al peso promedio, en miligramos, de las larvas sobrevivientes. Para analizar los datos de la primer variable, se utilizaron números de larvas sobrevivientes en lugar de los porcentajes de mortalidad, con el fin de evitar cualquier transformación innecesaria y simplificar la interpretación del análisis de varianza. Además, se suprimió el tratamiento cinco, cepa HD-1, por presentar una amplia variabilidad en su actividad. Así, en la tabla XXI se resumen los datos de sobrevivencia larval, de S. frugiperda a los extractos de la cepa GM-1, éstos son los tratamientos 1 al 4, mientras que el 6 fue el testigo en blanco.

El análisis de varianza de la tabla XXII, confirmó la utilidad del bloque al nivel de significancia de $P = 0.05$, lo que demuestra que sí existió al menos un grupo de larvas*, con un grado distinto de susceptibilidad a B. thuringiensis, apoyando la hipótesis alternativa propuesta originalmente**. Así el bloque I presentó las larvas más susceptibles, mientras que el grupo del bloque II fue el más resistente; aunque en realidad todos los demás bloques tuvieron grupos de lar

* Supra, pág. 81.

** Supra, pág. 87.

Tabla XXI. Larvas de *S. frugiperda* que sobrevivieron después de siete días, en dietas inoculadas a razón de 500 μ g/ml. de alimento, con extractos de la cepa GM-1*.

Bloques	Tratamientos					$\bar{y}.j$	DMS**
	1	2	3	4	6		
I	12	14	10	9	15	12	a
II	15	15	15	15	15	15	b
III	14	14	14	13	15	14	b
IV	14	13	15	15	14	14.2	b
V	14	12	15	14	14	13.8	b
VI	15	13	14	15	14	14.2	b

*La unidad experimental fue de 15 larvas distribuidas individualmente.

**Al nivel de significancia del 5%, las literales diferentes representan medias distintas.

Tabla XXII. Análisis de varianza para larvas de *S. frugiperda*, que sobrevivieron en dietas inoculadas con 500 μ g. de extractos de la cepa GM-1, por mililitro de dieta.

Fuentes de variación	G.L.	S.C.	C.M.	$F_{Calc.}$	$F_{Tab.}$	
					5%	1%
Bloques	5	25.07	5.01	2.93*	2.71	4.10
Tratamientos	4	4.14	1.04	0.61 N.S.	2.87	4.43
Error	20	34.26	1.71			
Total	29					

*Diferencia significativa.

C.V. = 0.09

N.S. = No existe diferencia significativa.

vas igualmente resistentes al II, según se observa en la prueba de medias de la tabla XXI. Por otra parte, el análisis de varianza no detectó algún efecto en los tratamientos y fueron estadísticamente idénticos al testigo sin inóculo. La confiabilidad de estos resultados es apoyada por el bajo coeficiente de variación, 0.09; que se logró durante esta fase del estudio.

La inactividad de los extractos de la cepa GM-1 de B. thuringiensis, podría deberse por lo menos a tres razones: i) que la genética de la GM-1 da lugar a cristales inactivos contra S. frugiperda, T. ni y H. virescens y quizá activos contra otras especies, como lo demostraron Dulmage (1979) para la línea HD-83 y Dulmage et al. (1981) en las variedades thuringiensis y kurstaki; ii) si la GM-1 mostró actividad, como lo reportaron Núñez (1980) y Murga (1983), entonces la cepa disminuyó su virulencia debido probablemente a condiciones de subcultivo o bien a conservación inadecuada; factores que afectan la potencia de las cepas de acuerdo con la revisión de Aizawa (1971) o bien, también es posible la incidencia de bacteriófagos durante el proceso de las fermentaciones que, según Krieg (1971), pueden originar una baja esporulación y formación de cristales; iii) por último, una tercera posibilidad es que los componentes de los medios de fermentación usados en el presente estudio, fueron incapaces de catalizar actividad; las fuentes de carbono y nitrógeno, jugo de agave y harina de soya, respectivamente, únicos componentes de los medios, representan condiciones virtualmente limitadas de crecimiento, más aún si se les contrasta con los medios descritos en la tabla VII*, estudiados por Dulmage (1970). Sin embargo, es difícil esclarecer cual de las anteriores hipótesis es

*Supra, pág. 49.

la más acertada, pues durante la revisión de los estudios de la GM-1 se presentó un panorama de resultados, en ocasiones inconclusos y -- otros difíciles de interrelacionar.* A pesar de todo, existe una gran posibilidad de que la hipótesis (i) esté más próxima a la realidad, -- pues salvo reportes como los encontrados en la tabla XVIII de este escrito, producto del error humano no existen antecedentes que confirmen las observaciones de Núñez (1980), ya que el 100% de mortalidad larval producido por la GM-1 contra T. ni, pregonado por Murga (1983) se fundamentó en estudios de Amparán (1982), quien reportó sus resultados de GM-1 contra T. ni en unidades internacionales, siendo la menor de -- 9,050 y la máxima de 14,500 UI, mientras que la actividad que encontró en esa misma cepa contra S. frugiperda fue 44% de mortalidad, la más alta. Todo esto resta importancia a la hipótesis (ii) y, por otra parte, la gran cantidad de fermentaciones en las que se ha hecho crecer la GM-1, utilizando medios tan simples como los del presente estudio, reportados por Amparán (1982), hasta otros más complejos como los experimentados por Murga (1983) y Maldonado (1980), disminuyen las posibilidades de la hipótesis (iii).

La actividad de la GM-1 ó la susceptibilidad de S. frugiperda, en términos de desarrollo larvario, fueron analizadas de la siguiente forma. Los datos de peso larval promedio de la tabla XX, fueron revisados en su normalidad y se encontró que los rangos de las observaciones por tratamiento, difieren mucho entre tratamientos, por lo que se realizó una transformación $\sqrt{X + 1}$, que es la indicada para conteos pe--

* Supra, pág. 12, pass. 2.1.6.

queños. La tabla XXIII presenta los datos transformados y la XXIV el análisis de varianza de ellos. Tanto el bloqueo como los tratamientos reflejaron diferencias altamente significativas, por lo que se rechaza la hipótesis nula de igualdad de medias y se acepta, que al menos un extracto redujo más el peso de las larvas que el testigo; mientras que la significancia de los bloques, apoyaron la hipótesis de que existen distintos grados de susceptibilidad de S. frugiperda, como resultado de su variación intraespecífica y que en este caso, al menos algún grupo de larvas provenientes de una de las masas de huevecillos usadas en el experimento, resultó ser más susceptible a B. thuringiensis. En la tabla XXV se muestra la prueba de medias de los tratamientos y la de los bloques, en ella se puede observar que los mejores extractos fueron el I y II de la GM-1, tratamientos 1 y 2, y el de la HD-1 representado por el tratamiento 5. El extracto II fue estadísticamente tan activo como el HD-1. Los extractos III y IV fueron los menos activos -- contrariando los resultados obtenidos en las fermentaciones y conteo de esporas, en los que el medio IV originó extractos más pesados y un mayor número de esporas por gramo.

Por otro lado, el grupo de larvas más susceptible de S. frugiperda, fue aquel que correspondió al bloque I, mientras que el más resistente fue el del número II. El resto de los bloques tuvieron grupos de larvas con susceptibilidad intermedia, diferente a ambos extremos -- según se observa. Estos últimos datos coinciden con la susceptibilidad, medida como sobrevivencia larval en la tabla XXI y sostienen la hipótesis de variabilidad genética para susceptibilidad; mientras que los efectos por tratamiento en el desarrollo larval, solo corroboran

Tabla XXIII. Transformación $\sqrt{X + 1}$ de los pesos promedio en larvas de S. frugiperda, que sobrevivieron por siete días en dietas artificiales inoculadas, a razón de 500 μ /g/ml. de alimento, con extractos de las cepas GM-1 y HD-1 de B. thuringiensis.

Bloques	Tratamientos						V.j =
	1	2	3	4	5	6	
I	1.323	1.174	1.509	1.43	1.107	5.687	2.038
II	2.269	2.194	3.51	2.977	2.143	6.717	3.302
III	1.916	1.502	2.87	2.815	1.581	6.137	2.804
IV	2.231	1.43	3.096	2.444	1.044	7.117	2.909
V	1.755	1.443	3.425	3.184	1.352	6.763	2.987
VI	1.749	1.292	3.534	2.815	1.455	7.138	2.997
$\bar{V}_{i\cdot} =$	1.888	1.506	2.991	2.611	1.447	6.593	$\bar{V}_{..} = 2.839$
Amplitud =	0.998	1.02	2.025	1.754	1.099	1.451	

Tabla XXIV. Análisis de varianza de los pesos larvales transformados a $\sqrt{X+1}$.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	F _{Calc.}	F _{Tab.}	
					5%	1%
Bloques	5	5.449	1.090	9.397**	2.6	3.85
Tratamientos	5	112.72	22.544	194.345**	2.6	3.85
Error	25	2.894	0.116			
Total	35	121.063				

**Diferencia altamente significativa.

C.V. = 0.12.

Tabla XXV. Comparación de medias de los pesos larvales en S. frugiperda, originadas por la actividad de los extractos de las cepas GM-1 y HD-1; y medias del peso larval por bloque, las que sugieren distintos grados de susceptibilidad a B. thuringiensis, en los diversos grupos larvarios de S. frugiperda dispuestos por bloque.

Actividad de <u>B. thuringiensis</u>				Susceptibilidad de <u>S. frugiperda</u>			
Ttos.	Medias originales	(peso larval) Transf.		Bloques	Medias originales	(peso/bloque) Transf.	
5	1.225	1.447	a	I	5.836	2.038	a
2	1.374	1.506	ab	III	9.375	2.804	b
1	2.682	1.888	b	IV	11.457	2.909	b
4	6.144	2.611	c	V	11.432	2.987	b
3	8.441	2.991	c	VI	12.036	2.997	b
6	42.744	39.559	d	II	12.474	3.302	c

DMS al 5%; las literales distintas indican medias diferentes.

observaciones cualitativas hechas en estudios precedentes con B. thuringiensis.

Yamvrias, citado por Heimpel y Angus (1963), concluyó en 1961 que algunas variedades de B. thuringiensis causaron una especie de diarrea, con síntomas crónicos de toxemia en A. kuehniella. Según Heimpel y Angus (1963) lo mismo ocurrió en B. mori, cuyas larvas presentaron además síntomas de letargo o pereza, inhibición de su alimentación y regurgitación. Con excepción de la toxemia crónica, todos los anteriores signos patológicos se presentaron en S. frugiperda en el presente estudio, aunque no en todas las larvas observadas. Lo que pudo haber ocurrido fue que las larvas ingirieron una concentración subletal de cristales, como lo sugiere la reducida alimentación de las dietas, inhibiendo la ingestión en las larvas, debido quizá al malestar en el mesenterón, reflejado en los síntomas de diarrea y vómito; malestar que desapareció en muchas ocasiones, cuando las larvas afectadas ligeramente fueron colocadas en dietas libres de inóculo. Esta última observación fue análoga a la que hicieron Heimpel y Angus en 1959, en A. kuehniella (Burgerjon y Martouret, 1971).

La reducción en el tamaño de las larvas, originada por la ingestión de esporas y cristales de B. thuringiensis, fue observada también por Amparán (1982) en S. frugiperda; por Dulmage et al. y Scherrer et al., citados por Amparán (1982), en H. virescens y M. sexta, respectivamente; aunque no se reportaron pruebas estadísticas de tal efecto, en ninguno de los casos. Posiblemente S. frugiperda pertenezca a las especies del grupo IV, propuesto por Martouret, Crison y colaboradores, citados por Heimpel y Angus (1963), en el cual se cuentan la mayoría -

de los noctúidos, que no muestran ninguna susceptibilidad aparente al cristal de B. thuringiensis, pero sí a una sustancia tóxica soluble y termoestable, liberada durante el tiempo de esporulación.* O quizá, - al grupo de especies clasificadas como del tipo III por Heimpel y Angus en 1959, entre las que se cuentan A. kuehniella y O. nubilalis y - cuyo pH intestinal, inferior a 8.9, no permite la disolución del cristal pero sí la germinación esporal. Sin embargo, hasta el presente, - no existen suficientes pruebas experimentales para aceptar alguna de - las hipótesis anteriores, salvo que S. frugiperda posee un pH intestinal alrededor de 8.0. (1)

4.2.3. Resultados de los bioensayos.

La tabla XXVI resume los datos obtenidos en dos bioensayos, en -- los cuales se probaron cinco dosis de extracto de la cepa GM-1 y del -- estándar internacional HD-1-S-1971, contra S. frugiperda. Los resulta -- dos en cada fecha, B_1 y B_2 , dan idea del comportamiento de las formula -- ciones en poblaciones de S. frugiperda y condiciones distintas. Los -- promedios, \bar{B} , de los porcentajes de mortalidad son graficados como or -- denados, con las dosis en el eje de abscisas para originar las curvas de actividad de las cepas HD-1 var. kurstaki y GM-1 de B. thuringien-- sis (figura 9). Mientras la HD-1 muestra una elevada actividad sobre el umbral de 1250 μg , la GM-1, con una toxicidad inferior, incrementó

* Supra, Pág. 38, inciso b.

(1) Datos sin publicar; Laboratorio de Cría Masiva, F.A.U.A.N.L.

Tabla XXVI. Mortalidad larval de *S. frugiperda*, originada en dos bioensayos con las formulaciones de la cepa GM-1 y el estándar internacional HD-1-S-1971 de *B. thuringiensis*.

Dosis* (μ g/ml de dieta)	M o r t a l i d a d (%)					
	GM-1			HD-1-S-1971		
	B ₁	B ₂	\bar{B}	B ₁	B ₂	\bar{B}
500	16	9	12.5	52	24	38.0
1000	29	12	20.5	91	60	75.5
1250	36	20	28.0	100	86	93.0
1500	41	28	34.5	100	100	100.0
2000	64	46	55.0	100	100	100.00

*Se utilizó un grupo de 25 larvas por cada dosis.

su potencia, al emplear dosis tan elevadas como 2000 μ g. de extracto por mililitro de dieta. Es importante recordar, que a medida que las dosis se alejen sobre 500 μ g/ml, se hacen menos factibles de uso - - práctico. Para realizar estimaciones de CL₅₀ se transformaron los datos de mortalidad y dosis, a unidades "probit" y logaritmos respectivamente, utilizando las tablas de unidades probit empíricos y trazando una línea de regresión aproximada. La tabla XXVII muestra las unidades transformadas, mientras la figura 10 presenta las líneas rectas, que representan la actividad de cada formulación.

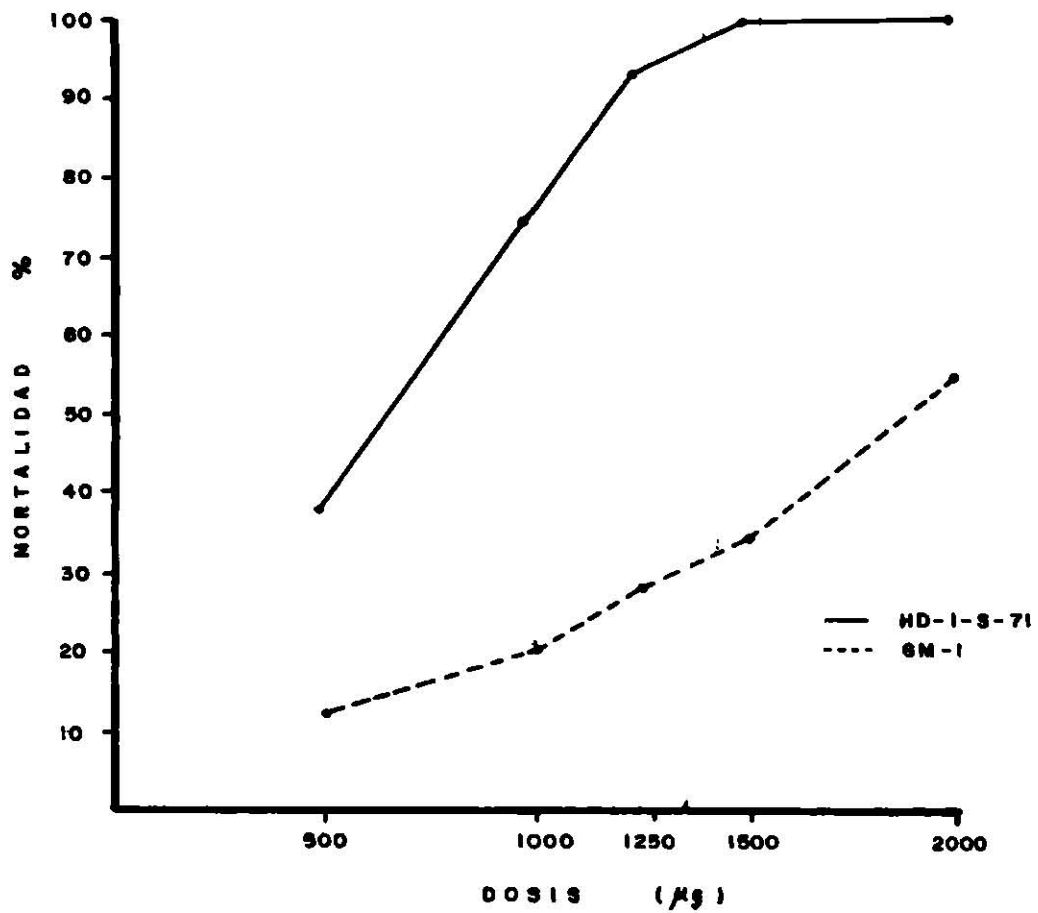


Figura 9. Actividad de la cepa GM-1 en contraste con el estándar internacional HD-1-S-1971.

Tabla XXVII. Datos de mortalidad y dosis de los bioensayos con *S. - - frugiperda*, transformados a la escala Probit-log.

Log dosis x	% mortalidad p	Probits empíricos	Probits esperados $y = 5 + \frac{1}{\sigma} (x - \mu)$
HD-1-S-1971			
2.69	38.0	4.6945	3.91
3.00	75.5	5.6903	6.50
3.09	93.0	6.4758	7.26
3.17	100.0	8.7190	7.93
3.30	100.0	8.1790	9.02
GM-1			
2.69	12.5	3.8497	3.79
3.00	20.5	4.1761	4.43
3.09	28.0	4.4172	4.62
3.17	34.5	4.6011	4.79
3.30	55.0	5.1257	5.06

Por último el cálculo de la concentración letal media, CL_{50} , para los dos extractos, utilizando el programa de análisis de regresión de las unidades "probit-log", originó los resultados que se resumen en la tabla XXVIII. Como se puede apreciar, la CL_{50} de la cepa GM-1 fue poco más de tres veces superior a la del estándar internacional, lo que representa una actividad bajísima. Además es importante hacer notar, que las pendientes de las líneas de regresión, diferentes entre la - -

GM-1 y el estándar, sugieren que el material de ambas formulaciones no es homólogo, lo que apoya en gran parte la segunda hipótesis, planteada al final del punto 4.2.2., más por el hecho del comportamiento del extracto, que por la naturaleza de la especie de insecto con que se -- trabajó, pues no se han encontrado reportes sobre la actividad de la -- exotoxina en S. frugiperda.

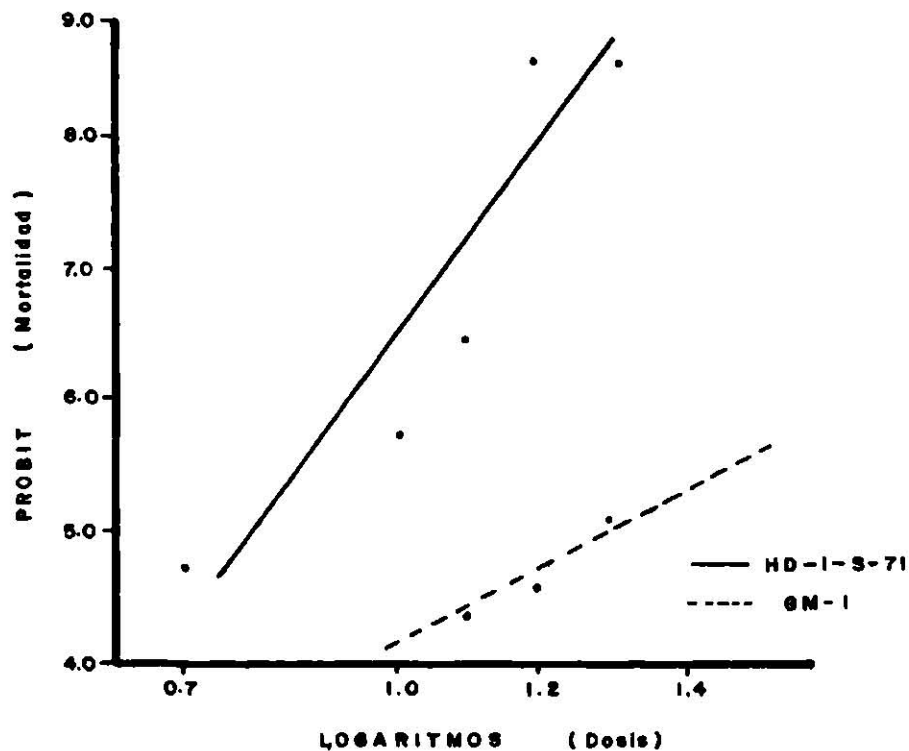


Figura 10. Líneas de regresión probit-log para la actividad de las cepas GM-1 y HD-1, durante los bioensayos.

La potencia en unidades internacionales de la cepa GM-1, se calcu
ló utilizando la siguiente fórmula:

$$UI = \frac{CL_{50} \text{ del HD-1-S-1971}}{CL_{50} \text{ de la GM-1}} \times 18,000;$$

siendo el resultado: 5,187.5 UI, una de las actividades más bajas en--
contradas durante las investigaciones con la GM-1.

Tabla XXVIII. Concentración letal media de los extractos de las cepas
GM-1 y HD-1-S-1971, determinada mediante un análisis de regresión en -
unidades probit-log.

Extracto	Pendiente	Concentración letal*		
		Máxima	Media	Mínima
GM-1	2.1178	2,814.58	2,113.5	1,780.7
HD-1-S-1971	4.5759	895.52	609.1	47.04

*Intervalo de confianza al 95%.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Como síntesis de los resultados derivados del estudio desarrollado, se presenta a continuación las principales conclusiones y algunas sugerencias importantes.

i) Los medios con 1.5% de harina de soya y 1.5 ó 3.0% de dextrosa, como únicas fuentes nutritivas, no fueron propicios para la formación de cristales ni la esporulación de la cepa GM-1, aún añadiendo 0.1% de carbonato de calcio, -- utilizado con frecuencia como amortiguador de pH en las -- fermentaciones con B. thuringiensis.

ii) Los medios con 1.5% de harina de soya y concentraciones variables de jugo de agave, 1.0, 1.5 y 3.0%, como únicas fuentes nutritivas, produjeron extractos -- con el complejo espora cristal- más pesados que un medio con 1.0% de ambos componentes, utilizado como testigo. El medio con la con-- centración más elevada de jugo de agave, dió lugar a los -- extractos más pesados, con un rendimiento promedio de 8.08 g/l.

iii) La harina de soya influyó en el peso de los extractos, aumentando la cantidad de sólidos inertes no de material -- celular sintetizado, como lo sugiere el conteo de esporas de las recuperaciones del testigo, medio I y el medio II -- (menor concentración de jugo de agave, punto ii).

iv) El número de esporas aumentó a medida que se incrementó la concentración de jugo de agave.

v) La variable reducción en el peso de las fermentaciones, que trató de introducirse durante el estudio, sólo se logró correlacionar con el rendimiento, utilizando una probabilidad de error de $P = 0.1$.

vi) Los extractos de la cepa GM-1 obtenidos de los medios con jugo de agave y harina de soya, no mostraron ninguna actividad, medida como % de mortalidad durante los ensayos preliminares con larvas de primer estadio de Spodoptera frugiperda, Trichoplusia ni y Heliothis virescens, ni durante el experimento en bloques al azar con S. frugiperda.

vii) El estándar internacional, HD-1-S-1971 var. Kurstaki, superó en actividad a todos los extractos de la cepa GM-1 y produjo una mortalidad promedio de 51.7%, durante el experimento en bloques al azar; sin embargo, mostró el rango de variación más amplio.

viii) Alguna actividad de la cepa GM-1 y HD-1 contra S. frugiperda, se pudo detectar en términos de reducción en el desarrollo larval; los extractos de los medios I y II disminuyeron 16 y 31 veces, respectivamente, el peso de las larvas, que se alimentaron en las dietas inoculadas con ellos, mientras que el HD-1-S-71 lo disminuyó Ca. 36 veces. La reducción del desarrollo larval provocado por el extracto II fue estadísticamente igual a la del estándar HD-1.

ix) El empleo de bloques, para distintos grupos larvales, determinó cierta variación genotípica en S. frugiperda, repre-

sentada por distintos grados de susceptibilidad; con la variable porcentaje de mortalidad se determinaron sólo dos grupos: el bloque I con el conjunto de larvas susceptibles y los bloques II al VI con larvas estadísticamente iguales en su resistencia (menos susceptibles que I). Mientras que con la variable peso larval, se detectaron 3 grupos: de nuevo el bloque I con las larvas más susceptibles, los bloques III al IV con una susceptibilidad intermedia y el bloque II con las larvas más resistentes.

x) La potencia de la cepa GM-1 de B. thuringiensis, medida por dos bioensayos contra S. frugiperda y probando simultáneamente el estándar internacional, HD-1-S-1971, fue de 5,187.5 UI con una concentración letal media de 2,113.5 µg/ml de dieta, que constituyen datos de una potencia por demás baja.

xi) La CL_{50} del HD-1-S-1971 fue 609.1 µg/ml de dieta y mató el 100% de las larvas a concentraciones promedio de 1,500 µg/ml de dieta.

xii) Las pendientes de las líneas de regresión en unidades probit-log para GM-1 y HD-1S-71, 2.1178 y 4.5759 respectivamente, sugieren que la formulación de la GM-1 no es homóloga a la del estándar, con la posibilidad de que la formulación GM-1 contenga mayor cantidad de esporas y menor proteína cristalífera, siendo por lo tanto menos tóxica.

Los cuatro objetivos propuestos inicialmente se lograron - -

indagar en una proporción considerable, v.gr.:

- a) se demostró que el aumento de la concentración en la -- fuente de carbono; hizo variar la producción de esporas y cristales, medida por el peso seco de extractos finales y por conteo de esporas;
- b) por medio de los bioensayos se evaluó la mortalidad larva varia en S. frugiperda provocada por la cepa GM-1, calculando además su CL_{50} ;
- c) no hubo ninguna variación en la virulencia de los extractos, representada por mortalidad larval, por lo que no se - pudo correlacionar a las variaciones en las fuentes de carbono; y
- d) se determinaron al menos dos grados de susceptibilidad larval en S. frugiperda.

Algunas recomendaciones pertinentes son las que se indican a continuación:

- 1) Con respecto a los medios con dextrosa, se sugiere experimentar concentraciones menores y/o buscar un balance adecuado en la fuente de nitrógeno, así como la inclusión de - factores de crecimiento, e.g. el complejo vitamínico presente en el líquido de remojo de maíz, que actúe como sistema coenzimático para favorecer la síntesis celular.
- 2) De acuerdo con las conclusiones de los puntos ii y viii, el mejor de los medios fue el II, en el cual se utilizó 1.5% de harina de soya y 1.0% de jugo de agave y es por lo tanto, el que se propone como base para estudios de esta naturaleza.

3) Para comprobar la calidad de los medios con harina de soya y jugo de agave, es recomendable que se fermenten en ellos cepas o variedades de B. thuringiensis, cuya potencia sea alta y bien conocida, e.g. HD-1 var. kurstaki y observar si esos medios son capaces de conservar en buena proporción, las propiedades tóxicas de una variedad potente, para sobre esta base tratar de mejorarlos, suplementándolos con elementos minerales tan necesarios en el crecimiento de microorganismos como potasio, magnesio, fósforo y otros requeridos en cantidades menores como zinc, cobalto, cobre y manganeso, entre otros.

4) La variable reducción del peso en las fermentaciones tuvo un valor relativo en el presente estudio, sobre todo para asociarla con el comportamiento de los medios fermentados a la vez.

5) Con respecto a la actividad de las cepas HD-1 y GM-1 contra S. frugiperda, es posible esperar un comportamiento similar sobre el desarrollo larval a nivel de campo, lo que favorecería la acción de sus enemigos naturales; sin embargo, para que esto se produzca serán necesarias dos cosas: condiciones análogas y una aspersion uniforme, pues se observó que las larvas recuperaban su vigor, cuando dejaban de alimentarse en la dieta inoculada. Así que es difícil hacer una recomendación en este sentido.

6) La irregular actividad de la HD-1 contra S. frugiperda,

mantiene vigente aún la imposibilidad de combatir económicamente esta plaga; esto es apoyado además, por las elevadas concentraciones que fueron necesarias para matar el total de larvas.

7) Como la cepa GM-1 es una excelente formadora de cristales, es importante que se indaguen las causas de la aparente atoxidad; empezando por la purificación de sus cristales, su aplicación oral ó intraperitoneal, per se o disueltos, en larvas susceptibles, de especies como B. mori, G. mellonella ó A. kuehniella.

RESUMEN

Esta investigación se desarrolló en los laboratorios de Microbiología Industrial y del Suelo de la Facultad de Ciencias Biológicas, y Cría Masiva de Insectos de la Facultad de Agronomía, de la U.A.N.L.. La cepa GM-1 de Bacillus thuringiensis Berliner se fermentó en seis medios; cinco con una concentración constante de 1.5% harina de soya y cantidades variables de jugo de agave o dextrosa; y uno empleado como testigo con 1% harina de soya y 1% jugo de agave. Ningún otro sustrato se añadió, --salvo CaCO_3 en los medios con dextrosa. Los extractos obtenidos fueron ensayados contra Spodoptera frugiperda (Smith), Heliothis virescens (Fab.) y Trichoplusia ni (Hubner) y sólo contra el primero se realizó una estandarización.

Los medios a base de dextrosa, 1.5 y 3.0 %, impidieron la formación de cristales y la esporulación; mientras que los formulados con jugo de agave, 1.0, 1.5 y 3.0 %, propiciaron una adecuada producción cristallífera. Sus rendimientos, medidos en peso seco de los extractos finales, fueron superiores a los del testigo y el medio con la mayor concentración, -- fue estadísticamente más productivo que todos y tuvo un promedio de 8.08 g/l, en cuatro fermentaciones. No obstante, la actividad de los extractos, medida por la reducción que provocaron en larvas de S. frugiperda, -- que se alimentaron en dietas inoculadas, indicó que el medio con 1.0 % de jugo de agave, con un rendimiento de 6.7 g/l fue el mejor debido a -- que mostó la mayor actividad, disminuyendo hasta 23 veces el peso larval.

Ninguno de los extractos fue activo, en términos de mortalidad -- larval, en las especies anteriores y contra S. frugiperda todos fueron superados por el estándar internacional, HD-1-S-1971 var. kurstaki; -- mismo que, sin embargo, tuvo un amplio rango de variación y originó un promedio de 51.7% muertes, con 500 $\mu\text{g/ml}$ de dieta. La potencia de -- una formulación con los extractos de la GM-1, fue de 5,187.5 UT y su CL_{50} 2,113.5 $\mu\text{g/ml}$ de dieta, por 609.1 en el estándar.

B I B L I O G R A F I A

- AIZAWA, K., 1971. Strain improvement and preservation of -- virulence of pathogens. In: *Microbial control of insects and mites*. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). - Academic Press, London. 655-672 pp.
- ANGUS, T.A., 1962. The biochemistry and mode of action of Bacillus thuringiensis Berliner and its varieties. *Entomophaga. Mem. Hors. Ser. Vol. 2*, 165-173 pp.
- AOKI, K. and Y. CHIGASAKI, 1915. Uber die pathogenitat der sog. Sottobacillen (Ishiwata) bei Seidenraupen. *Mitt. Med. Fak. Kais. Univ. Tokyo. Vol. 13*, 419-440 pp.
- ARONSON, A.I., et al., 1982. Relationship of the synthesis of spore coat protein and parasporal crystal protein in Bacillus thuringiensis. *J. Bacter.* Vol. 151, N° 1; 399-410 pp.
- ARROYO, R., 1982. Producción de bioinsecticida a partir de medios con almidón usando Bacillus thuringiensis GM-2. Tesis, Q.B.P., Facultad de Ciencias Biológicas, U.A. N.L., Monterrey, N. L. México.
- BAKER, K.F. and R.J. COOK, 1974. Biological control of -- plant pathogens. W.H. Freeman & Co. St. Francisco, U.S.A. 342-348 pp.
- BARJAC, H. de, 1981. Identification of H-serotype of bacillus thuringiensis. In: *Microbial control of pests*

and plant diseases (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. 35-43 pp.

BARJAC, H.de et A. BONNEFOI, 1973. Mise au point sur la classification de Bacillus thuringiensis. Entomophaga. Vol. 18, N° 1. 5-17 pp.

BEEGLE, C.C., H.T. DULMAGE and D.A. WOLFENBARGER, 1982. Relationships between laboratory bioassay-derived potencies and field efficacies of Bacillus thuringiensis isolates with different spectral activities. J. Invertebr. Pathol. Vol. 39, 138-149 pp.

BERLINER E., 1915. Uber die Schlaffsucht der Mehlmotterraupe (Ephestia kuehniella, Zell.) und ihren Erreger Bacillus thuringiensis, n. sp. Z. Angew. Ent. Vol. 2, 29-56 pp.

BOND, R.P.M., et al., 1971. The thermostable exotoxin of Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of insects and mites. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 275-303 pp.

BORROR, D.J., D.M. DE LONG and C.A. TRIPLEHORN, 1976. An introduction to the study of insects. 4th. ed. Holt, Rinehart & Winton, New York. 852 p.

BREED, R.S., E.G.D. MURRAY and A.P. HITCHENS, 1948. Bergey's manual of determinative bacteriology. 6th. ed. The Williams & Wilkins, Baltimore. 704- 762 pp.

- BRIGGS, J.D., 1963. Commercial production of insect pathogens. In: *Insect pathology. An advanced treatise.* (E.A. Steinhaus, ed.). Academic Press, New York. 519-548 pp.
- BUCHANAN, R.E. and N.E. GIBBONS (eds.), 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 8th. ed. The Williams & Wilkins, Baltimore. 529-536 pp.
- BURGERJON, A., 1962. Les methodes de tritage et la standardisation des preparations de Bacillus thuringiensis - - Berliner. Coll. Int. Pathol. insects. N° 1, 255-261 pp.
- _____ et C. YAMVRIAS, 1959. Tritage biologique des -- preparations a base de Bacillus thuringiensis Berliner vis-a-vis de Anagasta (Ephestia) kuehniella, Zell. C.R. Acad. Sci. 2871-2872 pp.
- _____ and D. MARTOURET, 1971. Determination and significance of the host spectrum of Bacillus thuringiensis. In: *Microbial control of insects and mites.* (H.D. - - Burges and N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 445-468 pp.
- BURGES, H.D., 1966. The standardization of products based on Bacillus thuringiensis. Mimeographed report of the conclusions of the meeting held in London, Eng. July, 1964. 12 p.

- BURGES, H. D., 1982. Control of insects by bacteria. *Parasitology*, Vol. 84, 79-117 pp.
- _____ (ed.), 1981. Progress in the microbial control of pests, 1970-1980. Academic Press, London. 1-6 pp.
- _____ and E.M. THOMSON, 1971. Standardization and assay of microbial insecticides. In: Microbial control of insects and mites. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 591-622 pp.
- _____ and N.W. HUSSEY (eds.), 1971. Microbial control of insects and mites. Academic Press, London. 1-11 pp.
- CARPENTER, P., 1979. Microbiología. 4a. ed. Traducido del inglés por los Dres. José R. Blengio, Roberto Espinoza Z. y Alberto Folch Pi. Interamericana, México 23-38 - pp.
- CASTRO, J.H., 1982. Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-1 y GM-2 en Spodoptera frugiperda y Trichoplusia ni -- (Lepidoptera: Noctuidae). Tesis, Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. Monterrey, N. L.
- CISNEROS, F.B., 1980. Evaluación de un insecticida biológico a base de Bacillus thuringiensis Berliner en -- maíz dulce para el control del gusano elotero, (Heliothis zea (Boddie), en Apodaca, N. L. Tesis sin publicar. I.T.E.S.M., Monterrey, N. L.

- COOKSEY, K.E., 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biochemistry and mode of action. In: *Microbial control of insects and mites*, (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 247-274 pp.
- COPPEL, H.C. and J.W. MERTINS, 1977. *Biological insect pest suppression*. Springer-Verlag-Berlin, Heidelberg, New York. 14-45; 130-159 pp.
- CORKE, A.T.K. and J. RISHBETH, 1981. Use of microorganisms to control plant diseases. In: *Microbial control of pests and plant diseases*. (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. 717-736 pp.
- COUCH, T.L., 1978. Formulations of microbial insecticides: Conventional formulations. *Misc. Publ. Ent. Soc. Amer.* 10(5):3-8. Vol. 10, N° 5. 3-8 pp.
- CUEVAS, R. G., 1975. Evaluación de la acción entomófaga de agentes microbianos sobre Heliothis virescens, Fab., en su primer estadio larval. Tesis sin publicar. I.T. E.S.M., Monterrey, N. L.
- DAVIDSON, R.H. and L.M. PEAIRS, 1966. *Insect pests of farm, garden and orchard*. 6th. ed. John Wiley & Sons, New York. 148-150 pp.
- DELAFIELD, F.P., H.J. SOMERVILLE and S.C. RITTENBERG, 1968. immunological homology between crystal and spore pro-

tein of Bacillus thuringiensis. J. Bacter. Vol. 96, N° 3. 713-720 pp.

DELUCCA, A. J., J.G. SIMONSON and A.D. LARSON, 1982. Bacillus thuringiensis distribution in soils of the United States. Can. J. Microbiol. Vol. 27, 865-870 pp.

_____, M. S. PALMGREN and A. CIEGLER, 1982. Bacillus thuringiensis in grain elevator dusts. Can. J. -- Microbiol Vol. 28, 452-456 pp.

DIRECCION GENERAL DE SANIDAD VEGETAL, 1979. Principales plagas del maíz. Bol. Tec. S.A.R.H. 27-30 pp.

_____, 1980. Principales plagas del sorgo para grano. Bol. Tec. S.A.R.H. 15-19 pp.

_____, 1982. Manual plaguicidas autorizados para 1982. S.A.R.H. México. 203 p.

DULMAGE, H.T., 1970. Insecticidal activity of HD-1, a new isolate of Bacillus thuringiensis var. alesti. J. Invertebr. Pathol. Vol. 15, N° 2. 232-239 pp.

_____, 1971. Economics of microbial control In: Microbial control of insects and mites. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 581-590 pp.

_____, 1971. Production of δ -endotoxin by eighteen -- isolates of Bacillus thuringiensis, Serotype 3, in 3 - fermentation media. J. Invertebr. Pathol. Vol. 18, N°

3. 353-358 pp.

DULMAGE, H.T., 1973. Report on the adoption of a primary -- U.S. reference standard for assay of formulations containing the δ -endotoxin of Bacillus thuringiensis. -- Bull. of the Ent. Soc. Amer. Vol. 19, N° 4 200-202 pp.

_____, 1979. Genetic manipulation of pathogens: Selection of different strains. In: Genetics in relation to insect management. (M. Hoy & J. Mckelvey, eds.). -- Rockefeller Foundation, New York, 116-127 pp.

_____, et al., 1971. A Proposed standardized bioassay formulations of Bacillus thuringiensis based on international units. J. Invertebr. Pathol. Vol. 18, 240-245 pp.

_____, et al., 1981. Insecticidal activity of isolates of Bacillus thuringiensis and their potential for pest control. In: Microbial control of pests and plant pathogens. (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. -- 193-222 pp.

_____, and H. DE BARJAC, 1973. HD-187, a new isolate of Bacillus thuringiensis that produces high yields of δ -endotoxin. J. Invertebr. Pathol. Vol. 22, N° 2. -- 273-277 pp.

_____, J. A. CORREA and A.J. MARTINEZ, 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-

-crystal complex of Bacillus thuringiensis. *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 15, N° 1. 15-20 pp.

DULMAGE H.T. and K. AIZAWA, 1982. *Distribution of Bacillus thuringiensis in nature*. In: *Microbial and viral Pesticides*. (E. Kurstak, ed.). Marcel Dekker, New York and Basel. 209-237 pp.

_____, and R.A. RHODES, 1971. *Production of pathogens in artificial media*. In: *Microbial control of insects and mites*. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 507-540 pp.

FALCON, L.A., 1971. *Use of bacteria for microbial control*. In: *Microbial control of insects and mites*. (H.D. -- Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 67-95 pp.

FAST, P.G., 1981. *The crystal toxin of Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial control of pests and plant diseases*. (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. -- 223-248 pp.

FINNEY, D.J., 1977. *Probit analysis*. 3th. ed. Cambridge -- University Press, London. 333 p.

FINNEY, J.R., 1981. *Potential of nematodes for pest control*. In: *Microbial control of pests and plant diseases*. - (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. 603-620 pp.

- FISHER, R.A., 1963. Bioassay of microbial pesticides. *Analytical methods for pesticides and food additives*. Vol. 2, N°6. 425-442 pp.
- FLORES, Y., 1981. Evaluación de Bacillus thuringiensis Berliner, en el control del gusano importado de la col Pieris rapae L. en Apodaca, N.L. Tesis Ing. Agr. Parasitólogo. I.T.E.S.M., Monterrey, N.L.
- GINGRICH, R.E. and M. HAUFLE, 1978. Components of Bacillus thuringiensis active against larvae of horn fly Haematobia irritans. *Folia Ent. Mexicana*. Vol. 39 y 40, 121-122 pp.
- GLASER, R.W., 1925. Specificity in bacterial disease with special reference to silkworms and tent caterpillars. Vol. 18, N°6. 769-771 pp.
- GOMEZ, H., 1980. Evaluación del daño causado por infestaciones artificiales del gusano cogollero Spodoptera frugiperda (J.E. Smith), sobre plantas de maíz en el campo. Tesis Ing. Agr. Parasitólogo. - Facultad de Agronomía, U.A.N.L., Marín, N.L., México.
- HALL, I.M., 1963. Microbial control. In: *Insect Pathology. An advanced treatise*. (E.A. Steinhaus, ed.). Vol. 2. Academic Press, New York. 477-517 pp.
- HANNAY, C.L., 1953. Crystalline inclusions in aerobic sporeforming bacteria. *Nature*, N° 172. p. 1004.
- _____ and P. FITZ-JAMES, 1955. The protein crystals -

of Bacillus thuringiensis Berliner. Can J. Microb. -
Vol. 1, N° 55. 674-710 pp.

HEIMPEL, A.M. and T.A. ANGUS, 1959. The site of action of -
crystalliferous bacteria in Lepidoptera larvae. J. In-
sect Pathol. Vol. 1, 152-170 pp.

_____, and T.A. ANGUS, 1963. Diseases caused by cer---
tain sporeforming bacteria. In: Insect pathology. An
advanced treatise. (E. A. Steinhaus, ed.). Vol. 2. -
Academic Press, New York. 21-66 pp.

HOFMASTER, R.N. and D.E. GREENWOOD, 1949. Fall armyworm con-
trol on forage and track crops. J. Econ. Ent. N° 42,
502-506 pp.

HOLLAND, W.I., 1968. The moth book. A popular guide to a -
knowledge of themoths of North America. Dover Publica-
tions, New York. 174-175 pp.

HOSKINS, W.M. and R. CRAIG, 1962. Uses of bioassay in ento-
mology. Ann. Rev. Ent. Vol. 7, 437-464 pp.

IGNOFFO, C.M., et al., 1981. Relative activity of Bacillus
thuringiensis var. kurstaki and Bacillus thuringiensis
var. israelensis against larvae of Aedes aegypti, - -
Culex quinquefasciatus, Trichoplusia ni, Heliothis zea
and Heliothis virescens. J. Econ. Ent. Vol. 74, N° 2.
218-222 pp.

_____, and R.F. ANDERSON, 1979. Microbial technology.

Microbial Processes. Academic Press, New York.

Vol. 1, N° 1. 1-27 pp.

JACOBS, M.B. and M.J. GERSTEIN , 1960. *Handbook of microbiology*. D. Van Nostrand, New York. 29-30 pp.

KRIEG, A., 1965. *Bioassay and standardization of Bacillus thuringiensis preparations: Spore-endotoxin-complex*. *Entomophaga*. Vol. 10, 49-53 pp:

_____, 1971. *Aposymbiosis, a possible method for anti microbial control of arthropods*. In: *Microbial control of insects and mites*. (H.D. Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 673-685 pp.

_____, 1981. *The genus Bacillus: Insect pathogens*. In: *the prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria*. (M.P. Starr, et al., eds.). Vol. II. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg, New York. 1743-1753 pp.

_____, and G.A. LANGENBRUCH, 1981. *Susceptibility of arthropod species to Bacillus thuringiensis*. In: *Microbial control of pests and plant diseases*. (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London. 837-896 pp.

KRYWIENCZYK, J., 1977. *Antigenic composition of δ -endotoxin as an aid in identification of Bacillus thuringiensis varieties*. Internal Report, Canadian Forest Service, IP-X-16. 11 p.

- KRYWIENCZYK, J., *et al*, 1981. Occurrence of hurstaki K-1 - - crystal activity in Bacillus thuringiensis subsp. - - thuringiensis serovar (H₁). J. Invertebr. Pathol N° - 37, 62-65 pp.
- LEVY, R. and D.H. HABECK, 1976. Descriptions of the larvae of Spodoptera sunia and Spodoptera latifascia with a key to the mature Spodoptera larvae of the eastern United States (Lepidoptera:Noctuidae). Ann. Ent. Amer. Vol. 69, N°4. 585-588 pp.
- LITTLE, V.A., 1972. General and applied entomology. 3th. Ed. Harper and Row, New York. 292-294 pp.
- LYSENKO, O., 1963. The taxonomy of entomogenous bacteria. In: Insect pathology. An advanced treatise. (E.A. -- Steinhaus, ed.). Vol. 2. Academic Press, New York. 1-17 pp.
- _____, and M. KUCERA, 1971. Micro-organisms as sources of new insecticidal chemicals: Toxins. In: Microbial control of insects and mites. (H.D. Burges & N.W. -- Hussey, eds.). Academic Press, London. 205-227 pp.
- MALDONADO, M.G., 1981. Producción de bioinsecticidas de - - Bacillus thuringiensis GM-1 utilizando tres diferentes medios de cultivo. Tesis, Química Bacteriología Parasitóloga. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N. L.

- MARGHERITIS, A.E. y H.F.E. RIZZO, 1965. *Lepidópteros de interés agrícola. Sudamericana, Buenos Aires. 115-118 pp.*
- MARTIN, P.A.W. and D.H. DEAN, 1981. *Genetics and genetic -- manipulation of Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of pests and plant diseases, 1970-1980. (H.D. Burges, ed.). Academic Press, London 299-311 pp.*
- McCONNELL, E. and L.K. CUTKOMP, 1954. *Studies with Bacillus thuringiensis in relation to the European corn borer. J. Econ. Ent. Vol. 47, N° 6. 1074-1082 pp.*
- METCALF, C.L. y W.P. FLINT, 1965. *Insectos destructivos e insectos útiles; sus costumbres y su control. Traducido de la 4a. ed. en inglés por Alonso Blackaller - - Valdés. C.E.C.S.A., México. 532-534 pp.*
- MURGA, M.A., 1983. *Toxicidad de Bacillus thuringiensis GM-2 en diferentes medios de cultivo. Tesis, Q.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L., Monterrey, N.L. México.*
- NORRIS, J.R., 1971. *The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis: Biosynthesis and physical structure. -- In: Microbial control of insects and mites. (H.D. - - Burges & N.W. Hussey, eds.). Academic Press, London. 229-246 pp.*
- _____, *et al.*, 1981. *The genera Bacillus and Sporolac-*

- tobacillus. In: *The prokaryotes. A handbook on habitats, isolation and identification of bacteria.* (M.P. Starr, et al., eds.). Vol. II. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York. 1711-1742 pp.
- NORRIS, J.R. and D.H. BURGESS, 1965. *The identification of Bacillus thuringiensis. International symposium on the identification and assay of viruses and Bacillus thuringiensis used for insect control.* London (1964). *Entomophaga*. Vol. 10, N° 1. 41-47 pp.
- NUNEZ, R.C., 1980. *Determinación de parasitismo en larvas de Spodoptera frugiperda (J.E. Smith).* Tesis, Ing. Agr. Parasitólogo. Facultad de Agronomía, U.A.N.L., Marín, N. L.
- OHBA, M., et al., 1981. *Two new subspecies of Bacillus thuringiensis isolated in Japan: Bacillus thuringiensis subsp. kumanotoensis (Serotype 18) and Bacillus thuringiensis subsp. tochigiensis (Serotype 19).* *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 38, 184-190 pp.
- OHBA, M. & K. AIZAWA, 1978. *Serological identification of Bacillus thuringiensis and related bacteria isolated in Japan.* *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 32. 303-309 pp.
- _____, and K. AIZAWA, 1981. *A new subspecies of Bacillus thuringiensis isolated in Japan: Bacillus thuringiensis (Serotype 17).* *J. Invertebr. Pathol.* Vol. 38. 307-309 pp.

- OHBA, M., K. AIZAWA and T. FURUSAWA, 1979. *Distribution of Bacillus thuringiensis serotype in Ehime prefecture, Japan. Appl. Ent. Zool. Vol. 14, N° 3. 340-345 pp.*
- PERLAK, F.J., C.L. MENDELSON and C.B. THORNE, 1979. *Converting bacteriophage for sporulation and crystal formation in Bacillus thuringiensis. J. Bacter. Vol. 140, N° 2. 699-706 pp.*
- PETERSON, A., 1962. *Larvae of insects. An introduction to nearctic species. Vol. 1. 5th. ed. Edward Bros., Ann Arbor, Mich., U.S.A. p. 97 y 180-196 pp.*
- PRASAD, S.S.S.V. and Y.I. SHETHNA, 1976. *Biochemistry and biological activities of the proteinaceous crystal of Bacillus thuringiensis. J. Scient. Ind. Res. Vol. 35. 626-632 pp.*
- RAMOS G., L.I., 1976. *Aislamiento de posibles entomotoxinas producidas por el hongo Metarrhizium anisopliae (metchn.) sor. Tesis, Maestría. I.T.E.S.M. Monterrey.*
- RINGS, R.W. and G.J. MUSICK, 1976. *A pictorial field key to the army worms and cutworms attacking corn in the north central states. Res. Circ. 221. Ohio. 26-27 pp.*
- SALAMA, H.S., et al., 1982. *Novel fermentation media for production of δ -endotoxins from Bacillus thuringiensis. In press.*
- SANCHEZ-MARROQUIN, A., 1977. *Mixed cultures in the production of single cell protein from Agave juices. Biotech*

& Bioengin. Symposium. John Wiley & Sons, Mexico. N° 7, 23-34 pp.

SCHERRER, P.P. LUTHY and B. TRUMPI, 1972. Production of δ -endotoxin by Bacillus thuringiensis as a function of glucose concentrations. Appl. Microb. Vol. 25, N° 4. 644-646 pp.

SCHESSER, J.H. and J.A. BULLA, 1978. Toxicity of Bacillus thuringiensis spores to the tobacco hornworm, Manduca sexta. Appl. Environ. Microb. N° 35, 121-123 pp.

SEBESTA, K., et al., 1981. Thuringiensin, the beta-exotoxin of Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of pests and plant disease. (H.D. Burges, ed). Academic Press, London. 249-281 pp.

SINGER, S., N.S. GOODMAN and M.H. ROGOFF, 1967. Defined - - media for the study of bacilli pathogenic to insects. Ann. N. Y. Acad. Sci. Vol. 139. 16-23 pp.

SMITH, N.R., R.E. GORDON and F.E. CLARK, 1952. Aerobic spore forming bacteria. U.S. Department of Agriculture, Monograph N° 16. 148 p.

SOMERVILLE, H.J., F.P. DELAFIELD and S.C. RITTENBERG, 1968. Biochemical homology between crystal and spore protein of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol. Vol. 96, N° 3. 721-726 pp.

- SPARKS, A.N. and E.R. MITCHELL, 1979. Economic thresholds of Heliothis species on corn. In: Economic thresholds and sampling of Helio- - this species on cotton, corn, soybeans and other host plants. (- U.S. Economic thresholds and sampling subcommittee, eds.) Southern cooperative series. Bull. N° 231, 51-56 pp.
- STEINHAUS, E.A., 1945. Insect pathology and biological control. J. - - Econ. Ent. Vol. 38, 591-596 pp.
- _____, 1949. Principles of insect pathology. McGraw Hill, New York. 228-317 pp.
- _____, 1951. Possible use of Bacillus thuringiensis Berliner as an aid in the biological control of the alfalfa caterpillar. Hilgardia, Vol. 20. 359-381 pp.
- _____, 1957. Concerning the harmlessness of insect pathogens and - the standardization of microbial control products. J. Econ. Ent. Vol. 50, No. 6. 715-720 pp.
- _____, 1968. Enfermedades microbianas de los insectos. En: Con- - trol biológico de plagas de insectos y malas hierbas. (P. DeBach, ed.). C.E.C.S.A., México. 607-645 pp.
- SUN, Y., 1950. Toxicity index. An improved method of comparing the re- - lative toxicity of insecticides. J. Econ. Ent. Vol. 43, No. 1. 45-53 pp.

- SWEETMAN, H.L., 1963. *The principles of biological control. Interrelation of hosts and pests and utilization in regulation of animal and plant population.* W.M.C., Brown, Iowa. 24-37 pp.
- TOUMANOFF, C. et C. VAGO, 1951. *L'agent pathogène de la flacherie des vers à soie endémique dans la région des Cévennes: Bacillus cereus var. alesti, var. nov.* Compt. Rend. Acad. Sci. Vol. 233. 1504-1506 pp.
- _____ et Y. LECORROLLER, 1959. *Contribution a l'étude de Bacillus cereus Frank. & Frank. cristallophores et pathogènes pour les larves de lépidoptères.* Ann. Inst. Pasteur, Paris. Vol. 96. 680-688 pp.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1982. *Bacillus thuringiensis - cultures disponibles from USDA.* ISSN-0193-3779. 42 p.
- WHITE, R.T. and S.R. DUTKY, 1940. *Effect of the introduction of milky diseases on populations of japanese beetle larvae.* J. Econ. Ent. Vol. 33, No. 2. 306-309 pp.

