

**ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA  
DEPARTAMENTO DE PROTECCION VEGETAL**

**EVALUACION DE  
CONCENTRACIONES DE TOXINAS  
*Bacillus thuringiensis*  
EN *Diatraea saccharalis* (Fabricius)  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

**Tesis presentada como requisito parcial para optar al  
título de Ingeniero Agrónomo en el grado  
académico de licenciatura**

**Por**

**Roxana Olivares Jiménez**

**Honduras, abril de 1997**

**El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana permiso para reproducir y distribuir copias de este trabajo para fines educativos. Para otras personas físicas o jurídicas se reservan los derechos de autor.**

---

**Roxana Olivares Jiménez**

**Honduras, 21 de abril de 1997**

**EVALUACION DE CONCENTRACIONES DE TOXINAS *Bacillus thuringiensis* EN *Diatraea saccharalis* (Fabricius)  
(LEPIDOPTERA: PYRALIDAE)**

Por

**Roxana Olivares Jiménez**

Aprobada: \_\_\_\_\_  
Allan J. Hruska, Ph.D.  
Asesor Principal

\_\_\_\_\_  
Michael Zeiss, Ph.D.  
Coordinados PIA- DPV

\_\_\_\_\_  
Fred Gould, Ph.D.  
Asesor

\_\_\_\_\_  
Allan J. Hruska. Ph.D.  
Jefe de Departamento DPV

\_\_\_\_\_  
Sarah Gladstone, Ph.D.  
Asesor

\_\_\_\_\_  
Antonio Flores, Ph.D.  
Decano Académico

\_\_\_\_\_  
Ronald D. Cave, Ph.D.  
Asesor

\_\_\_\_\_  
Keith Andrews, Ph.D.  
Director

**Para meditar**

*Mira que te mando que te esfuerces  
y seas valiente; no temas ni  
desmayes, porque Jehová tu Dios  
estará contigo en dondequiera que vayas  
Josué 1:9*

## **DEDICATORIA**

Todo este trabajo está dedicado a Dios, por haber sido mi fortaleza durante todo este año, y haber estado conmigo en todo momento. Sin su ayuda no hubiera sido posible.

A mis padres Luis y Sabina por todo el amor que me dieron mientras no estuve con ellos y el apoyo durante todos estos años.

A mi hermana Sandra, por su cariño incondicional y la amistad brindada en todo momento.

A mi sobrina Alejandra por ser como es.

## AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la capacidad y fuerzas suficientes día a día para continuar mis estudios.

A la Escuela Agrícola Panamericana por haberme concedido la oportunidad de realizar mis estudios de cuarto año.

A DIECA por haber aportado con especímenes necesarios para la realización de esta tesis.

A mis asesores Allan Hruska, Sally Gladstone, Dr. Cave y Dr. Fred Gould por toda su ayuda y colaboración.

A Hector Vanegas y Alejandro Vásquez por ayudarme en todos los pequeños detalles necesarios.

A Diana por haberme colaborado en la realización de los bioensayos.

A Cesar por haber compartido conmigo todos los buenos y malos momentos.

A todo el personal del Departamento de Protección Vegetal que me colaboraron en todo momento.

A todas las personas que de alguna u otra forma ayudaron para que este sueño se haga realidad.

## RESUMEN

La biotecnología ha desarrollado plantas transgénicas que son resistentes al ataque de ciertas plagas por la incorporación de genes de otras especies dentro de sus células. Actualmente se están introduciendo genes de toxinas de *Bacillus thuringiensis* a los cultivos para que puedan producir toxinas que los proteja del ataque de las plagas. Las toxinas a introducir deben ser evaluadas con anticipación para identificar la más efectiva para el control de una determinada especie de plaga. Con el presente estudio se pretendió 1) determinar el efecto de cuatro toxinas de *Bacillus thuringiensis* y el insecticida microbiológico Dipel sobre la mortalidad y el peso en el barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis* (Fabricius) en dieta artificial y 2) determinar la CL50 de dichas toxinas. Se evaluaron las toxinas: Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IC, Cry IF y el insecticida microbiológico Dipel® 4L, en nueve concentraciones diluidas de 20 a 0.000256 ug/ml y un testigo nulo en 90 larvas recién nacidas repartidas en tres repeticiones. Se tomaron datos de mortalidad a los 5, 10 y 15 días, al final del día 15 se pesaron las larvas. Con un ANDEVA se encontró diferencias significativas entre las toxinas y entre las concentraciones. Con el Programa Probit se determinó la CL50 de cada una de las toxinas. Las toxinas que causaron mayor mortalidad en las larvas de *D. saccharalis* fueron Cry IA(c) y Cry IA(b) a 20 y 4 ug/ml, las cuatro toxinas a 20 ug/ml y 4 ug/ml causaron una disminución en el desarrollo, esto nos da un amplio rango de protección a nuestros cultivos ya que, aunque la plaga no muera, no causará daños. Las CL50 mas bajas fueron de Cry IA(c) y de Cry IA(b). Ninguna de las concentraciones del Dipel® 4L tuvieron un efecto significativo sobre la mortalidad de *D. saccharalis*. Se recomienda evaluar combinaciones de estas toxinas mas efectivas sobre la mortalidad y el peso de *D. saccharalis* y la posible resistencia a estas toxinas.

## CONTENIDO

Portadilla.....	i
Derechos de autor.....	ii
Página de firmas.....	iii
Para meditar.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTO.....	vi
RESUMEN.....	vii
CONTENIDO.....	viii
INDICE DE CUADROS.....	ix
INDICE DE FIGURAS.....	x
INDICE DE ANEXOS.....	xi
<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. MATERIALES Y METODOS.....</b>	<b>23</b>
2.1 RECOLECCION DE <i>Diatraea spp.</i> .....	23
2.2 MANEJO Y CRIANZA DE <i>Diatraea saccharalis</i> .....	24
2.3 REALIZACIÓN DE LOS BIOENSAYOS.....	25
2.4 RECOLECCION Y ANALISIS DE LOS DATOS.....	27
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>28</b>
3.1. EFECTO DE LAS TOXINAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA MORTALIDAD DE <i>D. saccharalis</i> .....	28
3.1.1 Efecto de las toxinas sobre la mortalidad de <i>D. saccharalis</i> .....	28
3.1.2 Efecto de las concentraciones de las toxinas Bt sobre la mortalidad de <i>D.</i> <i>saccharalis</i> .....	29
3.2 EFECTO DE LAS TOXINAS Y LAS CONCENTRACIONES SOBRE EL PESO DE LAS LARVAS.....	17
3.2.1 Efecto de la toxinas sobre el peso.....	27
3.2.2 Efecto de las concentraciones de las toxinas Bt sobre el peso de <i>D. saccharalis</i> .....	27
<b>V. DISCUSION.....</b>	<b>29</b>
<b>VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>31</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>29</b>
<b>VIII ANEXOS.....</b>	<b>32</b>

**INDICE DE CUADROS**

CUADRO		Pag
1	Cantidad de toxina utilizada para obtener la concentración de 20 ug/ml.....	8
2	Análisis de varianza de las toxinas y concentraciones sobre la mortalidad de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	10
3	Promedio de mortalidades a los 15 días de las toxinas Bt a diferentes concentraciones sobre <i>Diatraea saccharalis</i> .....	15
4	Concentración letal media de las 4 toxinas Bt evaluada en <i>Diatraea saccharalis</i> .....	16
5	Análisis de varianza de las toxinas y concentraciones sobre el peso de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	21
6	Promedio de pesos a los 15 días de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	21

## INDICE DE FIGURAS

Figura		Pag
1	Efecto de las toxinas Bt sobre la mortalidad de <i>Diatraea saccharalis</i> a los 15 días.....	12
2	Efecto de las toxinas Bt sobre la mortalidad de <i>Diatraea saccharalis</i> a los 10 días.....	13
3	Efecto de las toxinas Bt sobre la mortalidad de <i>Diatraea saccharalis</i> a los 15 días.....	14
4	Efecto de las toxinas Bt sobre la mortalidad de <i>Diatraea saccharalis</i> a los 15 días.....	17
5	Curvas dosis respuesta para las 4 toxinas Bt en <i>Diatraea saccharalis</i> al día 5.....	18
6	Curvas dosis respuesta para las 4 toxinas Bt en <i>Diatraea saccharalis</i> al día 10.....	19
7	Curvas dosis respuesta para las 4 toxinas Bt en <i>Diatraea saccharalis</i> al día 15.....	20
8	Efecto de las toxinas Bt sobre el peso de <i>Diatraea saccharalis</i> .....	23
9	Efecto de las concentraciones de las toxinas Bt sobre el peso de larvas de <i>D. saccharalis</i> .....	24

**INDICE DE ANEXOS**

Anexo		Pag
1	Genes de proteína cristalina de <i>Bacillus thuringiensis</i> .....	33
2	Registro de mortalidades de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> durante los 15 días.....	34
3	Registro de pesos de larvas de <i>Diatraea saccharalis</i> al final de los 15 días.....	38

## I. INTRODUCCION

La biotecnología a través de la ingeniería genética está desarrollando plantas con características superiores a las convencionales, a través de la transferencia de genes extraños de otras plantas, virus y bacterias para obtener una planta con capacidad de producir su propio insecticida, resistencia a herbicidas específicos y resistencia a ciertas enfermedades. De manera que esta transformación genética de los genes insertados se manifieste en las nuevas generaciones, estas son llamadas plantas transgénicas (Webb y Morris, 1992).

Un organismo transgénico es un organismo cuyo material genético ha sido modificado de una manera que no se basa en el apareamiento y/o recombinación naturales. La modificación se hace mediante: recombinación del ADN que utilizan sistemas de vectores o la incorporación directa en una célula de material hereditario preparado fuera de la célula (Jaffé, 1996).

Las plantas transgénicas tienen un gran potencial para el manejo y control de plagas insectiles y enfermedades de plantas, para obtener cultivos tolerantes a herbicidas, cultivos que posean mayor cantidad del contenido proteico o que posean tolerancia al ataque de nemátodos de raíces (Gatehouse *et al.* 1992 ).

La introducción de genes extraños a las plantas puede traer efectos de índole socioeconómico, ecológico o relacionado con la salud de los seres humanos y animales. Los mayores riesgos que pueden ser considerados son: carácter herbáceo, flujo genético hacia parientes silvestres y erosión genética de las variedades criollas (Visser, 1996).

Carácter herbáceo es la característica que tiene un cultivar transgénico para convertirse en una maleza debido a la selección no intencional de rasgos herbáceos de una planta cultivada. Se sugiere que los rasgos que reducen los riesgos de evolución como malezas, como infertilidad, poca duración de la semilla y la dependencia de prácticas de cultivo, deben aprovecharse para controlar la expansión de plantas transgénicas en el caso de plantas en que esa posibilidad se considera como una opción necesaria.

Con el flujo genético muchas malezas pueden beneficiarse de los progresos de la ingeniería genética como resistencia a herbicidas, resistencia a insectos y tolerancia al stress. La relación genética estrecha entre el cultivo y parientes silvestres aumentará la probabilidad de flujo genético. Para evaluar dichos riesgos deben investigarse las propiedades del organismo receptor, los rasgos genéticos introducidos y el medio ambiente en el que se pretende realizar la liberación del organismo transgénico. Según Visser (1996), los cruces naturales pueden evitarse eficazmente siempre que las distancias sean del orden de decenas de kilómetros.

La introducción de cultivos transgénicos al medio ambiente puede contribuir a la erosión genética y a la disminución de la diversidad genética por la sustitución de variedades tradicionales, con características de adaptación a condiciones bióticas y abióticas locales, por variedades uniformes genéticamente. La capacidad de trasladar genes de una especie a otra podría contribuir a aumentar la uniformidad de las especies y al incremento de la vulnerabilidad genética.

Collwell (1994) reporta una lista de seis categorías relacionadas a los efectos que puede ocasionar los cultivos transgénicos al medio ambiente: la creación de nuevas malezas, la ampliación de los problemas de las malezas existentes hasta el momento, daño a las especies que no son problema, efectos secundarios en las comunidades bióticas, efectos adversos en los ecosistemas y desperdicio de los recursos biológicos valorables.

Posiblemente los cultivos transgénicos lleguen a convertirse en malezas en la agricultura o perturben los ecosistemas naturales, o que los genes recién introducidos se transfieran a especies silvestres dándoles mayor robustez. Dada esta situación, en todos los casos deben evaluarse los posibles efectos en los ecosistemas naturales, así también en los sistemas agrícolas (Visser, 1996).

La tecnología de plantas transgénicas esta siendo implementada para introducir genes de *Bacillus thuringiensis* (Berliner) a los cultivos para producir cristales proteicos con características insecticidas para protegerse del ataque de plagas (Hruska, 1997). *Bacillus thuringiensis* (Bt) es una bacteria que se encuentra en el suelo. Se han identificado varias razas de Bt que producen toxinas cristalinas químicamente diferentes que atacan a especies de insectos, nemátodos y protozoarios (Johnson, 1995). Las toxinas producidas por Bt son de cinco tipos con características diferentes:

- delta-endotoxinas
- beta exotoxinas
- alpha exotoxinas
- toxina antibiótica bacteriana
- toxina de factor piojo

Las delta-endotoxinas están codificadas con genes específicos que son tóxicos para diferentes órdenes de insectos (Gill *et al.*, 1992; Castillo *et al.*, 1995):

- |           |                              |
|-----------|------------------------------|
| - Cry I   | para lepidópteros            |
| - Cry II  | para dípteros y lepidópteros |
| - Cry III | para coleópteros             |
| - Cry IV  | para dípteros                |

Estos genes por su estructura, número y secuencia de aminoácidos poseen una subclasificación y taxonomía característica (Anexo 1), siendo cada vez más específicos contra especies de plagas de éstos órdenes, es decir, toxinas Bt que afectan a una especie pudieran no afectar a otras especies de la misma familia o del mismo género.

Por ejemplo en Dipel WP (16 000 UI de potencia/mg) se encontró que la CL50 para distintas razas de *Plodia interpunctella* (Hübner) fue variable e incrementándose de acuerdo al número de generaciones de insectos expuestos al Bt. El Dipel tiene como ingrediente activo *B. thuringiensis* var *kurstaki*. Esta variedad contiene diferentes razas que fueron estudiadas en *Elasmopalpus lignosellus* por Gilreath & Funderburk (1987 mencionado por Moar (1995)). Cuatro de estas razas resultaron ser más tóxicas: HD-1, HD-241, HD-246 y HD-263. HD-1 comprende cinco diferentes polipéptidos, tres Cry I y dos Cry II: Cry IA(a), Cry IA(b), Cry IA(c), Cry IIA y Cry IIB (Tabashnik, 1994). Tabashnik (1994) también estudió la existencia de la raza HD-73 de la variedad *kurstaki*, que contiene la toxina Cry IA(c).

Una de las mayores preocupaciones que se tiene en la implementación de plantas transgénicas es el desarrollo de resistencia de insectos plaga al Bt. Esto se debe principalmente a que estas plantas mantienen una constante dosis letal durante toda la temporada y una presión de selección hacia las poblaciones de plagas (Whalon y Norris, 1997). Experimentos de campo y laboratorio demostraron que ya existen insectos con capacidades de desarrollar resistencia a las plantas Bt a diferencia de las aspersiones de Bt las cuales se degradan con el paso del tiempo (Whalon y Norris, 1997).

Muchas compañías no están esperando hasta que venga un crisis de resistencia al Bt sino ya están desarrollando estrategias alternativas para el control de insectos resistentes al Bt (Gould, 1997). Se están desarrollando virus insecticidas y nuevas mutaciones de los genes de Bt y otros insecticidas microbiales están siendo también explorados. Este es el principio de la búsqueda para sustitutos de otros tóxicos, no el final.

En la actualidad existen algunas plagas insectiles que no son susceptibles a las actuales toxinas de Bt que hay hasta el momento, pero probablemente en un futuro no muy lejano se puedan descubrir proteínas cristalinas tóxicas para estas plagas (Peferoen, 1992).

En Norte América, esta nueva tecnología de la introducción de genes de Bt, está siendo muy estudiada para el combate de plagas como Noctuidae, Pyralidae, Tortricidae en maíz, *Heliothis virescens* (F), *Spodoptera* spp. en algodón (Gould, 1997), larva del escarabajo de la papa en papa (Gelernter, 1997).

Al parecer las plantas transgénicas resultan muy prometedoras para resolver la mayoría de los problemas de plagas que se tienen actualmente. Las plantas transgénicas, al tener incorporado en sus células genes específicos para combatir el ataque de ciertas plagas problemáticas, no son capaces de dañar otros insectos benéficos, enemigos naturales, ni otro tipo de animales que se alimentan de estas plantas.

Los cultivos Bt resultan ser también muy promisorios para los países en desarrollo, donde pueden contribuir a la disminución del uso de plaguicidas sintéticos y disminuir los peligros a la salud y al medio ambiente, aumentando el rendimiento y la producción de muchos de los cultivos (Hruska, 1997). Pero las variedades de plantas Bt desarrolladas en Norteamérica no son adaptadas a condiciones de Mesoamérica, ni a las plagas que se encuentran en esta región, debido a que las toxinas son específicas a ciertas especies de insectos, por lo que las toxinas de plantas Bt desarrolladas en Norteamérica no son necesariamente tóxicas para las plagas ni eficaces en los cultivos de esta región.

Muy pronto esta nueva tecnología se encontrará en Mesoamérica, entonces son necesarios que se realicen estudios sobre el comportamiento de las plagas y los cultivos frente a estas toxinas actualmente comercializadas en los Estados Unidos, analizando sus ventajas, desventajas y riesgos de la implementación y regulación legal.

En el presente trabajo se evaluaron estas toxinas Bt en *Diatraea saccharalis* (Fabricius). *D. saccharalis* es una plaga de la caña de azúcar, maíz y sorgo. Hace túneles o agujeros en el tallo reduciendo el vigor de las plantas (King y Saunders, 1984) e impidiendo la fructificación llegando a destruirla totalmente mediante acame o pudrición (Secretaria de Recursos Naturales. Honduras. 1978), En maíz puede destruir el follaje, provocar la muerte del cogollo y provocar daños a la mazorca, permitiendo la entrada de *Sitophilus* spp. (Coleoptera: Curculionidae). En ataques severos puede ocurrir hasta el 27% de pérdida del grano (Peairs *et al.*, 1980).

En la caña de azúcar puede ocasionar diferentes daños: fallas en el brote por daños a la estaca en la propagación, “corazón muerto” en plantas jóvenes, muerte de la panoja y parte superior del tallo en plantas adultas, ruptura y acame de la caña, reducción en el crecimiento, disminución en la calidad de la caña, la larva hace túneles y puede matar el punto de crecimiento de la caña. Estos daños en la caña pueden producir la entrada de otros insectos y patógenos (Reyes, 1989). Los daños causados por el barrenador del tallo de la caña de azúcar pueden reducir la cantidad de caña cosechada y por lo tanto la cantidad de azúcar disponible por unidad de peso de caña. En ataques severos puede producir el 100% de pérdidas (Torrez, 1997).

Los objetivos de la investigación fueron: 1) identificar la(s) toxina(s) que causan un efecto sobre la mortalidad y el peso de las larvas de *D. saccharalis*. 2) determinar el efecto que tienen las toxinas de Bt y el insecticida microbiológico Dipel® 4L sobre la mortalidad y el peso de *D. saccharalis*, 2) determinar la CL50 de las toxinas en *D. saccharalis*.

## II. MATERIALES Y METODOS

El presente trabajo se desarrollo en las siguientes partes: recolección de *Diatraea* spp. en el campo, manejo y crianza de *Diatraea saccharalis*, realización de los bioensayos y recolección y análisis de datos.

### 2.1 RECOLECCION DE *Diatraea* spp.

Para iniciar una cría de insectos se hizo la recolección de *Diatraea saccharalis* y *D. lineolata* (Walker), entre junio y noviembre de 1996. Se recolectaron las dos especies en diferentes etapas de desarrollo (huevos, larvas, pupas y adultos) en maíz, sorgo y caña de azúcar en los Departamentos de Francisco Morazán y Choluteca, Honduras. Para la recolección de especímenes se utilizaron: recipientes pequeños para el manejo y transporte de los especímenes, navaja o cuchillo para realizar los cortes en el tallo de la planta hospedera y bolsas o cajas para el transporte de los recipientes pequeños conteniendo los especímenes.

En el laboratorio se procedió a la identificación de los individuos recolectados y a la clasificación de larvas por tamaño para un mejor manejo. Las larvas eran colocadas en dieta artificial previamente preparada hasta llegar a pupas. Las pupas eran colocadas en platos petri y llevados a jaulas para su eclosión. Los adultos eran colocados en jaula para su reproducción.

Este pie de cría no se estableció completamente por distintas razones:

- Tiempo limitado para el desarrollo de la presente práctica.
- Comportamiento de las larvas en dieta artificial, muchas de de las larvas recolectadas entraron en diapausa por tener condiciones diferentes a las naturales, lo que dificultaba su desarrollo y reproducción.
- Poca reproducción al inicio de la formación del pie de cría, muy pocas terminaban su desarrollo.

## 2.2 MANEJO Y CRIANZA DE *Diatraea saccharalis*

Fue necesario la importación de 300 individuos de *D. saccharalis* en estado de pupa, proporcionados por la Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar en Costa Rica. Con estos individuos se estableció la cría de la cual se utilizó las larvas recién nacidas para la realización de los bioensayos. El manejo de esta cría se basó en las técnicas desarrolladas en el CIMMYT (Mihm, 1984).

El manejo de la cría y la realización de los bioensayos se realizaron en uno de los cuartos de cría del Centro para el Control Biológico en Centro América del Departamento de Protección Vegetal de la Escuela Agrícola Panamericana. El cuarto tenía como dimensiones 2.45 m por 2.45 m por 2.70 m de alto, temperatura promedio de 25 ° C, humedad relativa promedio 92 % y fotoperíodo 12: 12 horas (luz: oscuridad). Aquí se manejaba todas las diferentes etapas de desarrollo del insecto.

Para el manejo de la cría se utilizó dieta artificial F9775 (Bio Serv<sup>1</sup>) para *Diatraea* sp. Para la preparación de la dieta artificial se hizo hervir 4.6 l de agua fría, en el cual se disolvió el agar que se encuentra en el empaque de 4 l. Una vez apagada la hornilla, se añadió la dieta para *Diatraea*, mezclando todo con una cuchara de manera que no quedaran grumos. Se añadió 5 ml de formaldehído 37% (1 ml/l) para evitar la incidencia de hongos. Esta solución caliente de agar, dieta artificial y formaldehído fue colocado en una licuadora de 5 l y todos los ingredientes fueron mezclados durante tres minutos (Hensley, 1968).

Esta dieta artificial fue repartido en copas plásticas reutilizables de 1 onza (Bio Serv), donde se colocó de 6 a 7 ml de dieta artificial. Para facilitar su manejo, las copas se pusieron en cajillas plásticas reutilizables para 30 copas plásticas. En esta dieta artificial se colocaban los huevos o las larvas recién emergidas.

Los huevos se trataba de dos formas dependiendo del destino de las larvas. Para incrementar el pie de cría, las tiras de papel encerado eran cortados en trozos pequeños conteniendo una masa de huevos. Estos eran colocados en vasos con dieta artificial para su emergencia o dependiendo del tiempo existente, también se podían sacar los huevos del papel encerado y colocarlos en forma libre a la dieta sin que haya mucha diferencia en el número de larvas nacidas (Mihm, 1984). En estos vasos la mayor parte de las larvas completaba su desarrollo hasta la etapa de pupa. En caso de haber problemas con secamiento de la dieta u hongos, la larva era cambiada a otro vaso con dieta.

Si las larvas eran destinadas para la realización de los bioensayos, las tiras de papel eran cortada en trozos más grandes de aproximadamente 10 cm de largo y llevado a frascos de vidrio transparentes de 10 a 15 cm de diámetro (Mihm, 1984). El uso de frascos transparentes facilitaba la observación de las larvas recién nacidas, evitaba la ingestión de alimentos y facilitaba el manejo para colocarlas en dietas artificiales. Las larvas que sobraban de los frascos de vidrio, después de realizar los bioensayos, eran colocados en dietas con la ayuda de un pincel circular pelo de Martha en un número no mayor de 4 larvas por vaso.

---

<sup>1</sup> Bio Serv. Eighth street Frenchtown, N.J. 08825. P.O.BOX 450. Phone 908-996-2155. FAX 908-996-4123.

La revisión de las dietas para observar la existencia de pupas se lo hacía dos veces por semana. Las pupas eran sacadas de la dieta artificial con la ayuda de pinzas suaves, lavadas con una solución de cloro al 0.6%, secadas con papel toalla y colocadas en un plato petri, donde había una hoja de papel toalla a la medida del plato. Cada plato contenía un máximo de 70 pupas entre hembras y machos.

Estos platos petri se colocaban en jaulas hechas con malla metálica # 36 de 20 a 25 cm de diámetro por 30 a 35 cm de alto, juntamente con un vasito tapado conteniendo miel de abeja y levadura (2 g) en agua y un algodón a manera de mechero para que los adultos puedan alimentarse. En cada jaula se colocaban tiras de papel encerado Reynolds Cut-Rite®, de 10 por 30 cm. En los extremos de las jaulas se colocaban cartones de 35 cm por 35 cm que sirvieron de tapaderas de las jaulas para evitar que los adultos se escapen. En estas jaulas se encontraban toda la fase de reproducción, desde el estado de pupa hasta la muerte de los adultos.

Las jaulas fueron limpiadas de tres a cuatro veces por semana. En cada ocasión se cambiaba el vaso de miel, el papel encerado conteniendo los huevos, se reemplazaba las pupas emergidas y se sacaban los adultos muertos. Los huevos que se encontraban en las tiras de papel eran sacados tres veces por semana (Hensley, 1968).

La limpieza del cuarto de cría era imprescindible, al igual que la desinfección de todos los materiales a utilizar. Las copitas eran lavadas y desinfectadas en una solución de cloro al 1.0%. Los pinceles y pinzas eran sumergidas en alcohol 95% durante cinco minutos antes de ser utilizadas.

### 2.3 REALIZACIÓN DE LOS BIOENSAYOS

Una vez establecida la cría se procedió a la iniciación de los bioensayos con las diferentes pruebas. Se analizaron cinco tratamientos con nueve niveles en cada tratamiento. Como no se pudo realizar todas las pruebas a la vez, se hicieron pruebas apareadas usando la toxina Cry IA(c) como estandar para controlar la varianza debida a diferencias en dieta u otros factores. Se realizaron tres repeticiones de cada prueba. Cada concentración de los cinco tratamientos se evaluó con 30 larvas colocadas en forma individual en una copa plástica.

Los tratamientos eran las toxinas de Bt, proporcionados por el Dr. Fred Gould del Departamento de Entomología de la Universidad Estatal de Carolina del Norte, Raleigh. Las toxinas tenían las siguientes concentraciones: Cry IA(c) 12.5 g/l, Cry IA(b) 15.0 g/l, Cry IC 7.7 mg/g, Cry IF 15.0 g/l, y Dipel® 4L suspensión emulsificable ingrediente activo *B. thuringiensis* var. *kurstaki* con 8 800 U.I. de potencia por mg.

Los niveles de los tratamientos fueron las concentraciones utilizadas para las toxinas: 20, 4, 0.8, 0.16, 0.032, 0.0064, 0.00128, 0.000256 ug/ml y un testigo 0 ug/ml. En el Dipel® 4L se utilizaron las siguientes concentraciones:  $1 \times 10^{-3}$ ,  $2 \times 10^{-4}$ ,  $4 \times 10^{-5}$ ,  $8 \times 10^{-6}$ ,  $1.6 \times 10^{-6}$ ,  $3.2 \times 10^{-7}$ ,  $6.4 \times 10^{-8}$ ,  $1.28 \times 10^{-8}$  % y un testigo 0 %.

Para la preparación de los bioensayos se preparó la dieta artificial F9775 de 4 l siguiendo el mismo procedimiento mencionado en Manejo y Crianza de *Diatraea saccharalis*. La preparación de los diferentes niveles de tratamiento se realizaba cuando la dieta se encontraba a 65°C. Del total de la dieta preparada se destinaban 200 ml para colocar en las copitas correspondientes al testigo 0 de la toxina Cry IA(c) y 200 ml para el testigo 0 de la otra toxina a evaluar. Para obtener la concentración mayor de 20 ug/ml de las diferentes toxinas se elaboró Cuadro 1.

Cuadro 1 Cantidad de toxina utilizada para obtener la concentración de 20 ug/ml

Toxina	Cantidad de toxina (ug)	Cantidad de dieta (ml)
Cry IA(c)	400	250
Cry IA(b)	400	300
Cry IC	650	250
Cry IF	400	300
Dipel® 4 L al 1 %*	300	300

\* Para facilitar la medición se preparó previamente una solución al 1% de Dipel® 4L

La cantidad de toxina se midió con la ayuda de una repipeta de 10 a 100 ul de capacidad y la dieta se midió en un biker de 100 ml. La dieta y la toxina se mezclaban en la licuadora de 1.25 l. Luego se prepararon las diluciones sucesivas que consistían en: separar 50 ml de dieta en un biker, colocar el resto en 30 copas plásticas de 1 onza (6 a 8 ml de dieta por vaso), con la ayuda de una espátula se vació todo el material a las copitas. Nuevamente se colocaron los 50 ml separados anteriormente, se añadió 200 ml de dieta pura y se mezclaron ambos en la licuadora de 1.25 l. Se repitieron nuevamente las diluciones hasta obtener las concentraciones deseadas. Con la otra toxina a evaluar se utilizó el mismo procedimiento, teniendo cuidado de cambiar la punta de repipeta. Para cada toxina se trabajó con equipo diferente, para evitar contaminación entre toxinas.

La identificación de cada bioensayo se realizó por cada concentración, toxina, repetición y fecha de preparación, para evitar confusiones y tener un mejor control.

Una vez solidificada la dieta, en una cámara de aislamiento, se colocó en cada copa plástica una larva recién nacida (de 0 a 5 horas), que no había sido expuesta a ningún tipo de alimento, utilizando un pincel circular Pelo de Martha, previamente desinfectado con alcohol 95%. Las copas fueron cerradas con tapaderas de cartón para copas plásticas # 410 de 1 onza. Para cada prueba eran necesarios como mínimo 540 larvas (9 concentraciones x 30 copas x 2 toxinas).

## 2.4 RECOLECCION Y ANALISIS DE LOS DATOS

Cada copa de cada cajilla fue revisada a los 5, 10 y 15 días, durante el tiempo de exposición. Se anotó en cada ocasión la mortalidad de las larvas en cada una de las concentraciones de cada toxina y el total de larvas desaparecidas (Anexo 2). Se consideró larva muerta aquella que no presenta ningún movimiento ni reacción a ningún estímulo. El número de larvas muertas fue convertido a unidades de porcentaje para facilitar la interpretación de los datos. Las larvas desaparecidas durante el bioensayo no fueron tomadas en cuenta para los análisis. Se utilizó el Programa “EPA Probit Analysis Version 1.5” (U.S. Environmental Protection Agency) para identificar la CL50 para cada toxina en cada uno de los días de revisión.

En el día 15 se pesaron cada una de las larvas vivas en forma individual con una precisión del mg. Aquellas que tenían un peso menor al mg se pesaban en grupo de acuerdo a la concentración y a la toxina, para luego sacar un promedio individual (Anexo N° 3). Se tomaron datos del peso de las larvas identificando el mayor peso registrado, el menor peso y el promedio de las larvas sobrevivientes.

Para identificar el efecto de las toxinas, dosis y repeticiones en la mortalidad de las larvas y en el peso a los 15 días, se utilizó el paquete estadístico “Statistical Analysis Systems” (SAS) para realizar un ANDEVA y un análisis de medias utilizando la prueba SNK ( $P \leq 0.05$ ). Para observar mejor las diferencias de los efectos de las toxinas sobre los pesos de las larvas, se graficó los datos recolectados expresado en mg.

### III. RESULTADOS

En las concentraciones altas de todos los tratamientos se observó que las larvas de *D. saccharalis* dejaron de alimentarse en las primeras horas de exposición a la toxina Bt. Se vió afectada la sobrevivencia y el peso de las mismas, tal como lo describen Gill *et al.* (1992) y Castillo *et al.* (1995). En las cuatro concentraciones más altas las larvas se encontraron durante todo el ensayo en la superficie de la dieta, observando en estas un menor movimiento y menor reacción a estímulos. En las dos concentraciones más bajas y el testigo las larvas penetraron en la dieta donde desarrollaron en tamaño y peso, observándose en estas mayor movimiento dentro de la copa plástica y menor cantidad de dieta sobrante. Este poco desarrollo registrado, falta de alimentación y reducción en el movimiento nos ayuda, a nivel de campo, a controlar poblaciones de *D. saccharalis*.

#### 3.1 EFECTO DE LAS TOXINAS Y CONCENTRACIONES SOBRE LA MORTALIDAD DE *D. saccharalis*

La mortalidad de las larvas fue afectada claramente por las toxinas y las concentraciones de cada una de las toxinas (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis de varianza de las toxinas y concentraciones sobre la mortalidad de *Diatraea saccharalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Repeticiones	2	0.422	0.218	4.25	0.016
Toxinas	4	12.111	3.028	61.06	0.0001
Toxina*Repetición	8	0.387	0.048	0.97	0.4580
Concentraciones	8	17.888	2.236	45.09	0.0001
Toxina*Concentración	32	5.863	0.183	3.69	0.0001

##### 3.1.1 Efecto de las toxinas sobre la mortalidad de *D. saccharalis*

El porcentaje de mortalidad causado por Cry IA(c) en cada una de las repeticiones fue estadísticamente similar entre sí, por lo que no fue necesario realizar ningún ajuste con relación a esta toxina.

La toxina que causó mayor mortalidad a los 15 días fue Cry IA(c) (Cuadro 3). Las toxinas que causaron menor mortalidad fueron Cry IF y Cry IC. Dipel® 4L, no produjo un efecto notorio en la mortalidad de las larvas de *D. saccharalis* y se observó que no existieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones (Cuadro 3).

Cuadro 3. Promedio de mortalidades a los 15 días de las toxinas Bt a diferentes concentraciones evaluadas sobre *Diatraea saccharalis*.

Concentración (ug/ml)	Dipel	Cry IF	Cry IC	Cry IA(b)	Cry IA(c)
0	2 a*	0 a*	0 a*	0 a*	2 a*
0.000256	2 a	2 abc	4 ab	0 a	6 a
0.00128	0 a	1 ab	4 ab	18 ab	14 b
0.064	0 a	4 abc	15 abc	7 ab	13 b
0.032	1 a	5 abc	17 bcd	9 ab	31 c
0.16	2 a	0 a	17 bcd	11 ab	44 d
0.8	3 a	5 abc	28 cd	49 bc	67 e
4	7 a	36 c	47 de	78 c	84 ef
20	3 a	37 bc	74 e	89 c	94 f

\* Promedios en las misma columna seguidas con la misma letra no son significativas al 5% nivel de probabilidades según la prueba SNK.

### 3.1.2 Efecto de las concentraciones de las toxinas Bt sobre la mortalidad de *D. saccharalis*

A los 5 días, en la mayoría de las toxinas y a las concentraciones más altas se detectó hasta un 10% de mortalidad en las larvas de *D. saccharalis* (Figura 1). Este porcentaje es muy bajo para obtener un control efectivo a nivel de campo.

En el décimo día las diferencias en mortalidad se hicieron más notorias. Se ve el efecto de Cry IC, Cry IA(b) y Cry IA(c) de la misma magnitud en la máxima concentración evaluada. Con la concentración de 20 ug/ml de Cry IC, Cry IA(b) y Cry IA(c) se puede observar aproximadamente el 59% de mortalidad (Figura 2). En las concentraciones menores a 0.8 ug/ml las diferencias aún no son notorias con ninguna de las toxinas.

A los 15 días de exposición de las larvas, se notó el efecto de las toxinas y las concentraciones sobre la mortalidad de las larvas. Las más efectivas fueron Cry IA(c) y Cry IA(b) a concentraciones de 4 y 20 ug/ml, observándose una mortalidad entre 78% y 94% (Figura 3).

La mortalidad de las larvas de *D. saccharalis* difirió significativamente entre las concentraciones de cada toxina (Cuadro 2). Las medias de mortalidad entre las concentraciones 0.000256 y 0.00128 ug/ml en Cry IA(c) fueron significativamente ( $P \leq$

0.05) diferentes, en comparación de las demás toxinas donde no se encuentran diferencias significativas. Se observa que aún en el testigo se presentó un bajo porcentaje de mortalidad debido a causas extrañas a los tratamientos.

Cry IA(c) y Cry IA(b) a 20 y 4 ug/ml, causaron la mayor mortalidad en comparación de las otras concentraciones de las demás toxinas. Cry IC y Cry IF a 20 ug/ml presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ), ocasionando mortalidades de 74% y 37%, respectivamente. Entre todas las concentraciones evaluadas del Dipel® 4L no se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en la mortalidad de las larvas de *D. saccharalis*, siendo todas similares al efecto del testigo (Cuadro 3).

Al final de los 15 días, Cry IF no mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre las concentraciones 0.8, 0.16, 0.032, 0.0064, 0.00128, 0.000256 ug/ml, siendo las únicas diferencias entre las concentraciones de 4 y 20 ug/ml que provocaron mortalidades cercanas al 40%. Las concentraciones 4 y 20 ug/ml de Cry IC, causaron mortalidades entre 50% y 70%. Las concentraciones de 0.000256, 0.00128, 0.0064, 0.032, 0.16 de Cry IA(b) y el testigo causaron en promedio similar efecto de mortalidad a las larvas mientras que con concentraciones altas se obtuvo mortalidades entre 78% y 89% (Cuadro 3).

Con las concentraciones mayores de Cry IA(c) se observó entre el 84% y 94% de larvas muertas al final de los 15 días.

### 3.1.3 Comparación de CL50 entre toxinas

Con la CL50 se puede observar más claramente las diferencias entre toxinas en la mortalidad de las larvas de *D. saccharalis*. A los 5 días las CL50 de las toxinas estuvieron en un rango mayor a 30,000 ug/ml siendo esta una concentración 2,000 veces mayor a la obtenida en el día 10 (Figura 5).

La CL50 de Cry IF a los 10 días fue 18 veces mayor que la concentración más alta evaluada (Figura 6). Esto se compara con Cry IA(c) donde la CL50 a los 10 días quedó en el rango de la dos concentraciones más altas con las que se trabajó (Figura 6).

A los 10 días las CL50 para Cry IA(b) y Cry IA(c) son similares entre sí, y estas son menores a Cry IC y Cry IF (Figura 6).

Cuadro 4. Concentración letal media de las cuatro toxinas Bt evaluadas en *Diatraea saccharalis* a los 15 días.

<b>TOXINA</b>	<b>CL50 al día 15 ug/ml</b>	
Cry IA(c)	0.087	a*
Cry IA(b)	0.902	a
Cry IC	3.942	a
Cry IF	29.515	b

\*Medias seguidas con la misma letra no son significativas al 5% nivel de probabilidades, según la prueba SNK.

La CL50 de Cry IA(c) y Cry IA(b) en general fueron menores en comparación de las demás toxinas (Cuadro 4, Figura 5, Figura 6 y Figura 7) y entre ellos Cry IA(c) fue la más tóxica.

La CL50 más alta fue de Cry IF (29.515 ug/ml) (Cuadro 4). A los 15 días es 10 veces mayor que la CL50 de Cry IC, 30 veces mayor que la de Cry IA(b) y más de 300 veces mayor que la de Cry IA(c) (Cuadro 4). Hasta los 15 días, Cry IF no mató ni el 50 % de la población activa, requiriéndose para esto una concentración mayor (~ 30 ug/ml) (Figura 7).

### 3.2 EFECTO DE LAS TOXINAS Y LAS CONCENTRACIONES SOBRE EL PESO DE LAS LARVAS

Las larvas expuestas a las toxinas Bt dejaron de alimentarse, lo que se tradujo en un desarrollo significativamente más lento de las larvas y por lo tanto en un menor peso al final de los 15 días en comparación a aquellas larvas que no habían sido expuestas a ninguna toxina (Cuadro 5).

Cuadro 5. Análisis de varianza de las toxinas y concentraciones sobre el peso de larvas de *Diatraea saccharalis*.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Valor F	Pr > F
Repeticiones	2	660.082	330.041	4.98	0.008
Toxinas	4	10351.482	2587.870	39.06	0.0001
Toxina*Repetición	8	1467.205	183.400	2.77	0.0068
Concentraciones	8	42611.299	5326.412	80.40	0.0001
Toxina*Concentración	32	10199.371	318.730	4.81	0.001

### 3.2.1 Efecto de la toxinas sobre el peso

Todas las toxinas tuvieron un efecto significativo sobre el peso, en comparación de las larvas que no fueron expuestas a ninguna toxina (Cuadro 6). La toxina que causó menor crecimiento en las larvas de *D. saccharalis* fue Cry IA(c) (Cuadro 6). Las otras toxinas también causaron una disminución en el desarrollo de las larvas pero en menor grado que Cry IA(c), aunque no existen diferencias significativas entre ellas ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 6). Dipel® 4L al final de los 15 días en las concentraciones altas, produjo una disminución en el desarrollo viéndose reflejado en el peso de las larvas (Cuadro 6), mientras que en concentraciones bajas las larvas desarrollaron normalmente, manteniendo la reacción a estímulos.

Cuadro 6. Promedio de pesos a los 15 días de larvas de *Diatraea saccharalis* expuestas a toxinas Bt.

Concentración (ug/ml)	Dipel	Cry IF	Cry IC	Cry IA(b)	Cry IA(c)
0	46.34 a*	43.57 a*	73.81 a*	67.29 a*	54.15 a*
0.000256	44.84 a	16.4 b	13.77 b	34.28 b	5.76 b
0.00128	39.39 ab	12.63 b	6.91 b	8.98 c	1.65 b
0.0064	40.49 ab	10.95 b	1.44 b	2.15 c	0.502 b
0.032	36.70 ab	14.43 b	0.67 b	2.19 c	0.24 b
0.16	29.73 b	10.78 b	0.16 b	0.55 c	0.23 b
0.8	15.26 c	5.25 b	0.12 b	2.87 c	0.19 b
4	5.90 d	0.25 b	0.11 b	0.15 c	0.16 b
20	0.533 d	0.11 b	0.1 b	0.13 c	0.12 b

\* Medias en las mismas columnas seguidas con la misma letra no son significativas al 5% nivel de probabilidades según la prueba SNK.

### 3.2.2 Efecto de las concentraciones de las toxinas Bt sobre el peso de *D. saccharalis*

La diferencia en pesos entre las concentraciones evaluadas fue significativa ( $P \leq 0.05$ ) (Cuadro 5). Las tres concentraciones más bajas de Cry IA(c), Cry IC y Cry IF produjeron una disminución en el desarrollo de las larvas significativamente igual que las dos concentraciones más altas. Las dos concentraciones más altas resultaron en menor desarrollo de las larvas (Cuadro 6) en comparación al testigo ( $P \leq 0.05$ ). Cry IA(b) a concentraciones mayores a 0.16 ug/ml redujo el peso de las larvas en un 90% (Figura 9). Las concentraciones entre 0.00128 y 20 ug/ml provocaron una disminución en peso estadísticamente similar entre sí ( $P \leq 0.05$ ).

Todas las concentraciones de las toxinas provocaron una diferencia significativa ( $P \leq 0.05$ ) sobre el desarrollo de las larvas comparado al testigo. En el testigo los pesos son cerca a 100 veces más los pesos observados por la concentración más alta (Figura 8).

Con las concentraciones de 0.16 a 20 ug/ml de todas las toxinas a excepción del Cry IF el peso de las larvas fue menor a 1 mg (Figura 8).

Con Cry IF se observó disminución en el peso de más del 95% a concentraciones mayores a 4 ug/ml. A concentraciones bajas solamente redujo el 25% del peso.

## V. DISCUSION

En muchas de las larvas expuestas a concentraciones altas, se observó un bajo consumo de la dieta, por lo que las concentraciones altas produjeron una intoxicación más rápida, y la muerte se presentó más temprano en comparación con las concentraciones bajas. Al mismo tiempo se presentó un menor desarrollo en las larvas expuestas. Esta diferencia entre concentraciones fue encontrado también por Farrar y Ridgway (1995). El poco o ningún desarrollo de las larvas a los 15 días se debe también al efecto que tiene las toxinas al causar parálisis en el intestino medio de las larvas. Farrar y Ridgway (1995) encontraron que existía una correlación directa entre la concentración y la disminución de peso en las larvas de *Lymantria dispar* (L.) (Lepidoptera: Lymantriidae). Aparte el insecto queda debilitado y es más susceptible al ataque por patógenos o factores abióticos que pueden causar la mortalidad de las larvas, disminuyendo las poblaciones y el ataque que provocan en los cultivos donde se encuentran.

En el desarrollo de la práctica, se observó que las delta endotoxinas de Bt provocaron la muerte de las larvas de *D. saccharalis* a lo largo de los 15 días. Este mismo efecto fue registrado por Farrar y Ridgway (1995) cuando evaluaron esporas y proteínas cristalinas de Bt sobre *L. dispar*.

Lang *et al.* (1996) no encontraron diferencias a los 7 días entre concentraciones de 0.005 y 0.015 ug/ml de Cry IA(b) en la mortalidad y solo la pérdida del 10% de peso del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis* (Hübner)) (Lepidoptera: Pyralidae) en dieta artificial. Sin embargo, encontraron diferencias entre 0.05 y 0.15 ug/ml en la reducción del peso de más de 98%, a partir de la segunda generación expuesta a estas concentraciones. En este trabajo, se observó que Cry IA(b) en concentraciones menores a 0.16 ug/ml no causaba una mortalidad significativa, mientras que en concentraciones mayores a 0.16 ug/ml afectó la mortalidad en más del 30% de las larvas, reduciendo el crecimiento notablemente. Las concentraciones que provocan un control efectivo contra *D. saccharalis* se pueden comparar con el trabajo realizado por Lang *et al.* (1996) al introducir dos niveles de Bt (< 1 ug/ gr de tejido fresco y 10 ug/gr de tejido fresco) en plantas de maíz contra el barrenador europeo del maíz, observando un daño mínimo en estas plantas transformadas en comparación con el testigo sin Bt introducido.

A diferencia de los resultados encontrados por Moar *et al.* (1995) que encontró que la CL50 para Cry IC a los 5 días fue tres veces menor que Cry IA(b) y cinco veces menor que Cry IA(c) evaluado en *Elasmopalpus lignosellus* (Zeller) (Lepidoptera: Pyralidae), MacIntosh *et al.* (1990 reportado por Moar *et al.* (1995)) encontraron que para *O. nubilalis* la CL50 de Cry IA(c) era similar al encontrado por Moar *et al.* (1995). La CL50 de Cry IA(b) para *Maruca testulalis* (Geyer) (Lepidoptera: Pyralidae) era menor a 1 ug/ml. En el presente trabajo se encontró que la CL50 de Cry IC es 30 veces mayor que la de Cry IA(b) y esta última es 10 veces mayor que la de Cry IA(c).

Gould (1995) observó que la CL50 para Cry IA(c) varía de acuerdo a la razas de *Heliothis virescens* (F.) (Lepidoptera: Noctuidae); encontró que a una concentración de 0.032 ug/ml el peso promedio de las larvas varió entre 1.47 mg a 40 mg en las dos razas evaluadas. Esto difiere de lo que se observó en *D. saccharalis* donde a esas concentraciones se obtuvo un peso promedio de 0.1 mg, es decir un peso 10 veces menor al encontrado por Gould (1995).

Así mismo en Dipel WP (16,000 UI de potencia/mg) se encontró que la CL50 para distintas razas de *Plodia interpunctella* (Hübner) (Lepidoptera: Pyralidae) fue variable e incrementándose de acuerdo al número de generaciones que fueron expuestos al Bt (McGaughey *et al.*, 1988).

El Dipel® 4L a las concentraciones evaluadas no produjo efectos significativos sobre las larvas de *D. saccharalis* mientras que Charpenter *et al.* (1973) en pruebas de campo utilizaron  $10 \times 10^9$  UI/acre obteniendo un 91% de control contra larvas de *D. saccharalis*. Farrar y Ridgway (1995) utilizaron 1000 UI/ml en dieta artificial como concentración mayor, haciendo cinco diluciones sucesivas; ellos evaluaron tasas relativas de consumo y sobrevivencia en *L. dispar* encontrando que a altas concentraciones el desarrollo disminuía en tres veces en comparación de las bajas concentraciones. McGaughey y Beeman (1988) utilizaron nueve diluciones en serie desde 500 a 1.95 mg/kg para evaluar la resistencia en *P. interpunctella* en dieta artificial obteniendo una sobrevivencia del 30% de la larvas en la primera generación , lo que aumentó hasta un 80% en la quinta generación.

## VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las toxinas de Bt demuestran perspectivas para el control de *D. saccharalis* ya que afectan a estas disminuyendo el número de individuos o paralizando su alimentación. Para el control de *D. saccharalis* las toxinas que provocan un mayor efecto sobre la mortalidad de las larvas son Cry IA(c) y Cry IA(b) a concentraciones de 20 y 4 ug/ml y Cry IC a 20 ug/ml. Existe un rango más amplio de toxinas que provocan una parálisis alimenticia de las larvas: Cry IC, Cry IA(b) y Cry IA(c) a las concentraciones de 20, 4, 0.8 y 0.16 ug/ml, e incluso Cry IF a 20 y 4 ug/ml, lo que significa que aunque exista sobrevivencia de larvas, estas no causarán daño al cultivo.

Se observó que Cry IA(b) en concentraciones menores a 0.16 ug/ml no causaba un número significativo de larvas muertas. En concentraciones mayores afectó la mortalidad en más del 30% de las larvas y redujo el crecimiento de las larvas en un 90%.

Para matar el 50% de la población activa de *D. saccharalis* a los 10 y 15 días, es recomendable utilizar Cry IA(b) y Cry IA(c), por ser estas las que en concentraciones bajas provocan mayor mortalidad de larvas. Cry IC a una concentración menor de 5 ug/ml mata el 50 % de la población activa en 15 días, a las mismas concentraciones logra disminuir siete veces el desarrollo de las larvas. Con todas las concentraciones de Cry IC se obtiene una disminución en la alimentación provocando pesos hasta cinco veces menor que el testigo.

Cry IF en ninguna de las concentraciones produjo un efecto significativo sobre la mortalidad de las larvas, pero se pudo observar que existió un efecto antialimentario con las concentraciones altas, reflejándose este efecto en los pesos al final de los 15 días.

El Dipel® 4L a las concentraciones evaluadas no causa ningún efecto sobre la mortalidad ni mucho menos reduce el desarrollo de las larvas. Esto no significa la ineficacia del Dipel® 4L, pues aspersiones en el campo han dado buenos resultados para el control de diferentes lepidópteros. Se recomienda evaluar Dipel® 4L a concentraciones más elevadas similares a las utilizadas en las toxinas.

Los resultados de este trabajo no se pueden generalizar para otras especies del mismo género, ya que el efecto que tienen estas toxinas Bt y estas concentraciones son específicos para *D. saccharalis*.

Sería recomendable evaluar la combinación de estas toxinas para ver el efecto sinérgico o antagónico de las toxinas sobre las larvas. Para dichas combinaciones se recomienda utilizar Cry IA(b), Cry IA(c) y Cry IC, por resultar las más efectivas en esta prueba.

Para tener un estudio completo del efecto de las toxinas sobre *D. saccharalis* sería necesario evaluar la resistencia que podrían adquirir las larvas a estas toxinas, es decir, el número de generaciones necesarios para que el efecto de las toxinas que se encuentran incorporadas en una planta empiece a disminuir .

## VII. BIBLIOGRAFIA

- Castillo, P., N. Acosta y A. Ciliezar. 1995. Control biológico de plagas artrópodos. pag 51-77. En: R. Cave (ed.). Manual para la enseñanza del control biológico en América Latina. Zamorano - Honduras.
- Charpentier L.J., R.D. Jackson y W.J. McCormick. 1973. Sugarcane borer: Control by delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*, HD-1, in field test. J. Econ. Entomol. 66(1): 249-251.
- Colwell, R.K. 1994. Potential ecological and evolutionary problems of introducing transgenic crops into the Environment. pag 33-46. En: A.F. Krattiger, A. Rosemarin (eds.). Biosafety for sustainable agriculture: Sharing Biotechnology Regulatory Experiences of the Western Hemisphere. ISAAA. Stockholm.
- Farrar, Jr R.R. y R.L. Ridgway. 1995. Feeding behavior of gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) larvae on artificial diet containing *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 24(3): 755 - 761.
- Gatehouse, A.M.R., V.A. Hilder y D. Boulter. 1992. Plant genetic manipulation for crop protection. U.K. Redwood Press. 266p.
- Gelernter, W. 1997. Productos transgénicos para el control de plagas: Su desarrollo y comercialización. pag 40- 53. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana. Zamorano Academic Press.
- Gill, S.S., E.A. Cowles y P.V. Pitrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.
- Gilreath, M.E. y J.E. Funderburk. 1987. Entomopathogens for suppression of lesser cornstalk borer. pag 18. En: Proceeding, American Peanut Research and Education Society. vol 19. Orlando Florida.
- Gould, F. 1997. Integración de plantas plaguicidas creadas por la Ingeniería Molecular, a la agricultura mesoamericana. pag 7-39. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana. Zamorano Academic Press.
- Gould, F., A. Anderson, A. Reynolds, L. Bumbgarner y W. Moar. 1995. Selection and genetic analysis of *Heliothis virescens* (Lepidoptera: Noctuidae) strain with high levels of resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. J. Econ. Entomol. 88(6): 1545-1559.
- Hensley, S.D. y A.M. Hammond Jr. 1968. Laboratory techniques for rearing the sugarcane borer on an artificial diet. J. Econ. Entomol. 61(6): 1742-1743.
- Hruska, A.J. 1997. Cultivos transgénicos en la agricultura mesoamericana. pag 1-6. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). Plantas Transgénicas *Bacillus thuringiensis* en la Agricultura Mesoamericana. Zamorano Academic Press.
- Jaffé W. 1996. Armonización de la bioseguridad en las américas. Construyendo capacidades institucionales. IICA. San José, C.R. 221 p.
- Johnson, M.T. 1995. The Role of Natural Enemies in Ecology and Evolution of *Heliothis virescens* on Transgenic Plants. Ph.D. thesis. North Carolina University. Raleigh, N.C.

- King, A.B.S. y J.L. Saunders. 1984. Las plagas invertebradas de cultivos anuales alimenticios en América Central. ODA. London.
- Lang, B.A., D.J. Moellenbeck, D.J. Isenhour, S.J. Wall. 1996. Evaluating resistance to Cry IA(b) in european corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) with artificial diet. *Resistant Pest Management*. 8: 29-31.
- MacIntosh, S.C., T.B. Stone, S.R.Sims, P.L. Hunst, J.T. Greenplate, P.G. Marrone, F.J. Perlak, D.A. Fischhoff y R.L. Fuchs. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 258-266.
- McGaughey, W.H. y R.W. Beeman. 1988. Resistance to *Bacillus thuringiensis* in colonies of indianmeal moth and almond moth (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 81(1): 28-33.
- Mihm, J.A. 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva e infestación de insectos, en la selección de plantas hospederas para resistencia a los taladradores del tallo del maiz *Diatraea* sp. CIMMYT. El Batán, México. 23 p.
- Moar, W.J. , M. Pusztai-Carey y T.P. Mack. 1995. Toxicity of purified proteins and the HD-1 strain from *Bacillus thuringiensis* against lesser cornstalk borer (Lepidoptera: Pyralidae). *J. Econ. Entomol.* 88 (3): 606-609.
- Peairs, F.B. y J.L. Saunders. 1980. *Diatraea lineolata* y *Diatraea saccharalis*. Una revisión en relación con el maíz. *Agronomía Costarricense*. (C.R). 4(1): 123-125.
- Peferoen, M. 1992. Engineering of insect resistant plants with *Bacillus thuringiensis* crystal protein genes. pag 135-153. En A.M.R. Gatehouse, V.A. Hilder, D. Boulter (eds.). *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. Redwood Press. U.K.
- Reyes, R. 1989. Sorghum stem borers in Central and South America. ICRISAT International workshop on sorghum stem borers. ICRISAT Center. India. p 49-60.
- Secretaria de Recursos Naturales. Honduras 1978. El barrenador del tallo del maíz. Hoja divulgativa N° 53.
- Tabashnik, B.E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annu. Rev. Entomol.* 39: 47-79.
- Torrez, J.M. 1997. Comunicación personal. Compañía Azucarera Hondureña. CAHSA.
- U.S. Environmental Protection Agency. Probit Program Versión 1.5. Ecological Monitoring Research Division. Environmental Monitoring Systems Laboratory. Cincinnati, Ohio 45268.
- Visser, B. 1996. Evaluación del conocimiento actual en cuanto a los riesgos ecológicos de la introducción en el medio ambiente de organismos genéticamente modificados, con especial énfasis en los ecosistemas andinos. pag 33-48. En: W. Jaffé (ed.). *Armonización de la bioseguridad en las américas*. Construyendo capacidades institucionales. IICA. San José, Costa Rica.
- Webb, K.J. y P. Morris. 1992. Methodologies of plant transformation. pag 7-43. En A.M.R. Gatehouse , V.A. Hilder, D. Boulter (eds.). *Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. Redwood Press. U.K.
- Whalon M.E. y D. L. Norris. 1997. Manejo de resistencia de plagas y despliegue de plantas transgénicas: Perspectivas y recomendaciones en regulaciones para Mesoamérica. pag 70-94. En: A.J. Hruska y M. Lara (eds.). *Plantas Transgénicas*

# ANEXOS

EVALUACION DE CONCENTRACIONES DE TOXINAS *Bacillus thuringiensis* EN  
*Diatraea saccharalis* (FABRICIUS) (LEPIDOPTERA PYRALIDAE)

Este documento consta de los sgtes directorios:

**DOCUM** Contiene los siguientes archivos:

- CARATU.DOC Corresponde a la presentación de la tesis desde la portadilla, hasta los índices. Consta de 11 paginas . En esta parte se encuentra el resumen de la tesis.

- TESIS.DOC Se encuentra el desarrollo de la tesis: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones y recomendaciones. Las páginas se encuentran enumeradas de acuerdo a la presentación en el documento. Las páginas que faltan en este documento corresponden a las figuras.

**FIGURAS** Donde se encuentran los siguientea archivos.

- FIG1234.XLS. Las figuras 1, 2, 3 y 4 del trabajo de tesis se encuentran en este archivo

- FIG89.XLS. Las figuras 8 y 9 se encuentran en este archivo.

- SUM5.SP5 La figura 5 se encuentra en Programa de Sigma Plot.

- SUM10.SP5 La figura 6, se encuentra en Progarama de Sigma Plot.

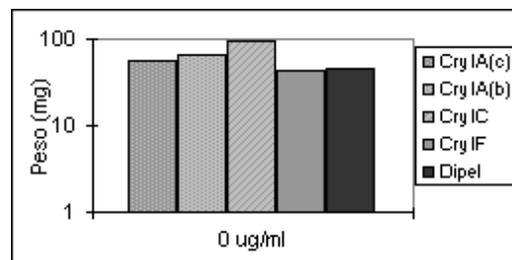
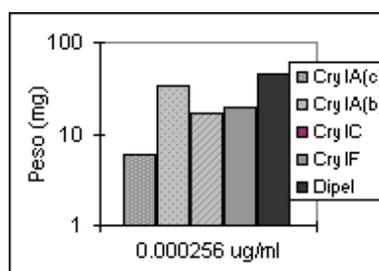
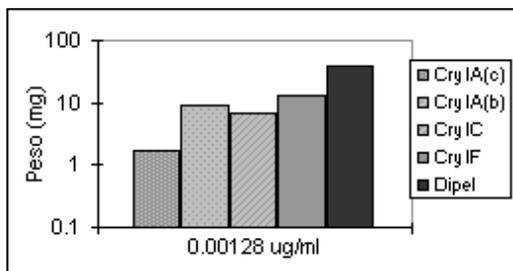
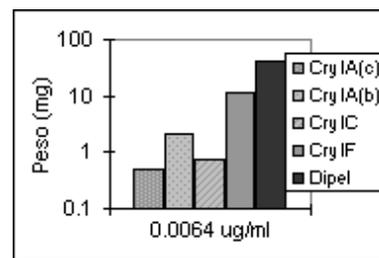
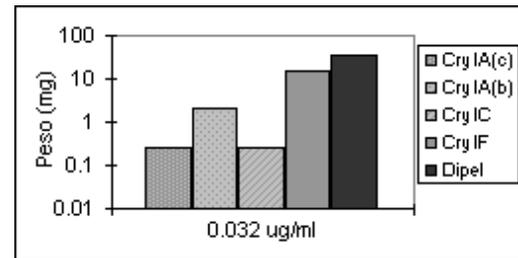
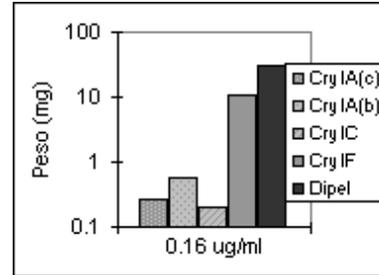
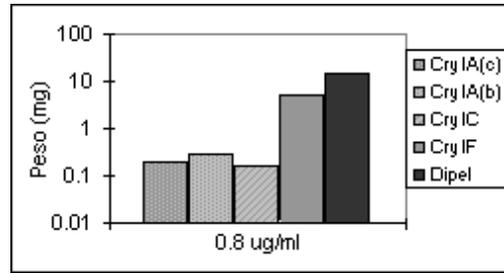
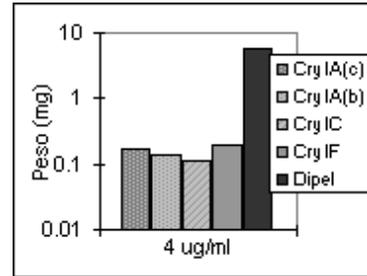
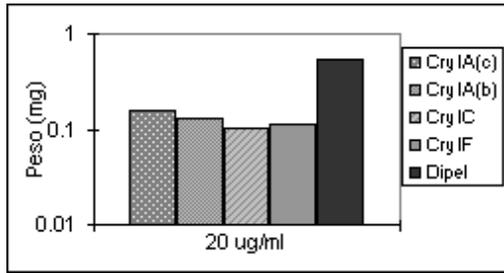
- SUM15.SP5 La figura 7 s encuentra en Programa de Sigma Plot.

**ANEXOS.** Contiene 3 archivos correspondientes a los anexos de la tesis:

- ANEX1.DOC

- ANEX2.XLS

-ANEX3.XLS



Anexo 1 Genes de proteina cristalina de *Bacillus thuringiensis*.

Cry	Raza de Bacillus thuringiensis	Peso molecular de la proteina.
Cry IA(a)	HD - 1	133.2
Cry IA(b)	Berliner 1715, HD-1	131.0
Cry IA(c)	HD - 73	133.3
Cry IB	HD - 2	138.0
Cry IC(a)	HD - 110	134.8
Cry IC(b)		134.0
Cry ID	HD - 68	132.5
Cry IE	HD - 146	132.55
Cry IF		133.6
Cry IIA	HD - 263, HD-1	70.9
Cry IIB	HD - 1	70.8
Cry IIIA	tenebrionis	73.1
Cry IIIB	tolworthi	74.2
Cry IIIC	galleriae	129.4
Cry IVA	israelensis	134.4
Cry IVB	israelensis	127.8
Cry IVC	israelensis	77.8
Cry IVD	israelensis	72.4
Cyt A	israelensis	27.4

Basado: Peferoen M. (1992).

y Gill, S.S. Cowles, E.A. Pietrantonio P.V. (1992).

## Relacion Dipel - CRY IA(c) Repeticion No 1

## dipel

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	28	27	30	28	30	27	25	27	30
Peso maximo (mg)	1.000	16	34.000	58	80.000	121	73	#####	96
Peso minimo(mg)	<0.001	<0.001	<0.001	6.000	18.000	9.000	6.000	3.000	22
Peso promedio *	0.143	2.269	14.767	27.179	36.167	42.038	44.32	51.357	49.267

## cry IA(c)

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	0	6	9	20	23	25	20	23	29
Peso maximo (mg)		<0.001	<0.001	<0.001	1.000	4.000	12.000	27	86
Peso minimo(mg)		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1	1	18.000
Peso promedio		#####	#####	0.15	0.167	0.68	2.611	7.739	48.759

## Relacion Dipel - CRY IA(c) Repeticion No 2

## dipel

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	23	22	21	24	29	25	24	18	27
Peso maximo (mg)	5.000	21	45.000	66	55.000	67	73	#####	94
Peso mínimo(mg)	<0.001	<0.001	9	8.000	14.000	12.000	16.000	18.000	2
Peso promedio	#####	8.545	15.762	31.292	31.931	29.840	30.875	36.44	44.852

## cry IA(c)

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	1	2	7	10	8	19	12	15	29
Peso máximo (mg)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	1.000	19	121
Peso mínimo(mg)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	3.000
Peso promedio	0.1	#####	#####	0.2	0.125	0.579	0.166	5.133	41.896

## Relación Dipel - CRY IA(c) Repeticion No 3

## Dipel

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	25	27	29	29	27	30	26	30	27
Peso maximo (mg)	<0.001	28.00	38.00	89.00	72.000	85	91	89.000	67
Peso minimo(mg)	<0.001	1.00	2.00	9.00	4.000	12.000	11.000	20.000	21
Peso promedio	0.240	6.888	15.241	30.714	42.00	49.594	43	46.724	44.889

## cry IA(c)

	20	4	0.8	0.16	0.032	0.0064	0.0013	0.0003	Testigo 0
No de individuos	2	6	9	20	24	29	28	29	29
Peso maximo (mg)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1.000	11.000	12	87
Peso minimo(mg)	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	1	17.000
Peso promedio	0.08	#####	#####	0.1	0.167	0.307	3.259	4.965	42.89

## Dipel

## Repeticion No 1

DIA	20		4		0.8		0.2		0.032		0.0064		0.00168		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	30	0	30	1	30	0	30	1	30	0	27	0	25	0	29	0	30	0
5°	30	0	30	1	30	0	30	2	30	0	27	0	25	0	29	0	30	0
8°	30	0	30	1	30	0	30	2	30	0	27	0	25	0	29	0	30	0
10°	29	0	30	1	30	1	30	2	30	0	27	0	25	0	29	1	30	0
15°	29	1	28	1	30	1	30	2	30	0	27	0	25	0	29	1	30	0

## CRY IA(c)

DIA	20		4		0.8		0.2		0.032		0.0064		0.00128		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	30	1	29	0	30	0	30	0	30	0	30	0	29	0	29	2	29	0
5°	30	2	29	0	30	1	30	0	30	0	30	0	28	0	29	2	29	0
8°	30	5	29	3	30	2	29	1	30	0	30	0	28	0	29	2	29	0
10°	28	14	29	12	27	5	29	1	30	0	27	0	28	0	29	2	29	0
15°	26	26	25	19	25	16	25	5	27	4	26	1	25	5	25	2	29	0

## Dipel

## Repetición 2

DIA	20		4		0.8		0.2		0.032		0.0064		0.00168		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	29	0	28	4	26	0	25	0	30	0	26	0	24	0	30	1	29	2
5°	29	0	28	4	26	0	25	0	30	0	26	0	24	0	30	1	29	2
8°	27	0	28	4	26	0	24	0	30	0	26	0	24	0	30	1	29	2
10°	25	1	27	4	26	1	24	0	30	0	25	0	24	0	30	1	29	2
15°	25	1	25	4	25	1	24	0	30	1	25	0	24	0	30	1	29	2

## CRY IA(c)

DIA	20		4		0.8		0.2		0.032		0.0064		0.00168		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	30	3	29	0	30	0	29	1	28	3	28	0	29	2	28	2	29	0
5°	30	5	29	3	30	4	27	1	27	2	28	0	29	2	28	2	29	0
8°	27	15	27	10	27	9	23	2	23	3	26	4	27	5	27	4	29	0
10°	24	15	27	10	20	4	20	3	23	5	26	4	26	10	26	4	29	0
15°	19	18	12	10	11	4	13	3	23	15	25	4	25	11	23	6	29	0

## Dipel

## Repeticion No 3

DIA	20		4		O.8		0.2		0.032		0.0064		0.00128		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	30	0	29	0	30	0	30	0	30	0	30	0	29	0	30	0	29	0
5°	29	0	28	0	30	0	30	0	29	0	30	0	29	0	30	0	27	0
8°	29	0	28	0	30	0	30	0	29	0	30	0	29	0	30	0	27	0
10°	29	0	27	0	30	0	30	0	29	0	30	0	28	0	30	0	27	0
15°	27	2	27	0	30	1	30	1	28	1	30	0	27	0	30	0	27	0

## CRY IA(c)

DIA	20		4		O.8		0.2		0.032		0.0064		0.00168		### 256		Testigo 0	
	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M	E	M
2°	30	0	30	0	30	1	29	0	30	0	29	0	29	0	29	0	30	0
5°	29	0	29	0	30	1	28	0	29	0	29	0	28	0	29	0	29	0
8°	29	4	29	1	30	2	28	0	29	0	29	0	28	0	29	0	29	0
10°	29	9	29	4	27	4	28	1	29	0	29	0	28	0	29	0	29	0
15°	25	23	21	18	21	12	25	5	27	3	30	1	28	0	29	0	29	0