

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

POSGRADO INTERINSTITUCIONAL EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES



HEREDABILIDAD DE LA RESISTENCIA AL COMPLEJO ESPORA-CRISTAL DE *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) EN UNA POBLACIÓN DE *Plutella xylostella* DE GUANAJUATO

TESIS

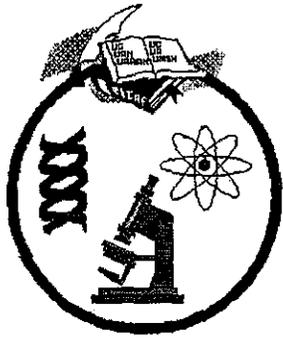
Presentada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS

Presenta:

JOSÉ TRINIDAD LÓPEZ PÉREZ

Zapopan, Jalisco. Mayo de 2002



POSGRADO INTERINSTITUCIONAL
EN CIENCIAS AGRICOLAS Y
FORESTALES

PICAF

Esta tesis titulada "Heredabilidad de la resistencia al complejo esporocristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) en una población de *Plutella xylostella* de Guanajuato" fue realizada bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:



UAA



UAAQ



UdeC



UdeG



UMSNH



UAN

**MAESTRIA
EN CIENCIAS AGRÍCOLAS Y FORESTALES**

CONSEJO PARTICULAR

TUTOR:


DR. MARCELINO VAZQUEZ GARCIA

ASESOR:


DR. ENRIQUE PIMIENTA BARRIOS

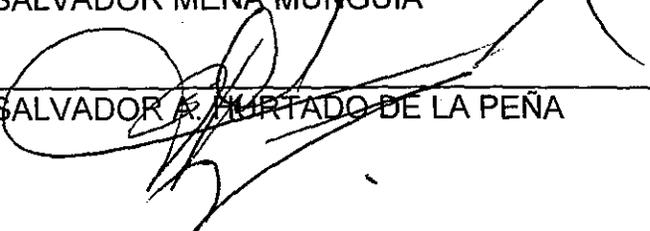
ASESOR:


M.C. GIL VIRGEN CALLEROS

ASESOR:


M.C. SALVADOR MENA MUNGUIA

ASESOR:


M.C. SALVADOR A. HURTADO DE LA PEÑA

AGRADECIMIENTOS:

UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA, por fomentar la responsabilidad ante la sociedad para afrontar el futuro sin miedo a seguir.

Laboratorio de Entomología, por el financiamiento y facilidades otorgadas para el desarrollo del presente trabajo de investigación de posgrado.

Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional; en especial a la Lic. Laura Aguilar y Dr. Jorge E. Ibarra.

M.C. Salvador Mena Munguia, por su amistad, confianza y constante motivación para seguir adelante.

Dr. Marcelino Vázquez García, por depositar su confianza para realizar esta investigación de maestría.

Dr. Enrique Pimienta Barrios, por el entusiasmo que me brindo para llegar al final de esta investigación.

M.C. Gil Virgen Calleros, por sus acertadas sugerencias para el desarrollo de este trabajo.

Ing. Javier Elizarraras Villalpando, por su apoyo incondicional.

DEDICATORIAS:

DIOS NUESTRO SEÑOR:

Por permitirme llegar al termino de un ciclo más y porque en ti deposité mis esperanzas y deseos para lograr culminar con éxito este anhelo.

MIS PADRES:

**LORENZO LÓPEZ TRUJILLO
MARIA ESTELA PÉREZ DE LÓPEZ**

Quienes con su labor callada, llena de sacrificios y esfuerzos me apoyaron a formarme en esta nueva etapa, para no desfallecer.

MIS HERMANOS:

MARCELA, LUIS Y PAULINA, que de alguna manera contribuyeron en mi formación y de quienes me siento orgulloso.

RESUMEN

El cultivo de las crucíferas en nuestro país se está convirtiendo en uno de los más importantes, debido a que requiere de una gran mano de obra para su cultivo y a la gran captación de recursos económicos que se obtiene.

Uno de los problemas que se presentan en este cultivo es el ataque de la palomilla de diamante *Plutella xylostella* (L.), que es uno de los insectos fitófagos y contaminantes de mayor importancia durante la etapa de producción de las crucíferas.

El control de la palomilla se basa en insecticidas organosintéticos y productos a base de *Bacillus thuringiensis*, sin embargo, se ha registrado desde 1990 que los insectos tienen la capacidad de desarrollar resistencia a las toxinas de *B. thuringiensis* bajo condiciones de campo.

La realización del presente trabajo llevó a la comprobación de que se puede dar la resistencia en campo a *B. thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) si éste se expresa en un solo producto comercial, además, de que se determinaron los niveles de susceptibilidad de *Plutella xylostella* a *B. thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) de lo cual se puede concluir que por los fenómenos que se presentan, como la mala aplicación del insecticida, el viento y el horario en que se aplica, no ha logrado alcanzar una resistencia en grado de alerta.

Se comprobó que la adquisición de la resistencia del complejo esporacristal en el insecto es debido a un gene parcialmente recesivo.

Con lo anterior se sugiere que se conforme una estrategia de monitoreo de la resistencia y que sea aplicado para así estar enterados de los cambios que se presenten en la susceptibilidad del insecto y que el uso de productos derivados a base de *B. thuringiensis* sea restringido a una generación por cultivo.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| AGRADECIMIENTOS | i |
| DEDICATORIAS | ii |
| RESUMEN | iii |
| LISTA DE CUADROS | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. REVISIÓN DE LITERATURA | 4 |
| 2.1 Características Generales de <i>Plutella xylostella</i> (L) | 4 |
| 2.2 Descripción morfológica y hábitos | 4 |
| 2.3 Control de la Palomilla Dorso de Diamante | 7 |
| 2.4 Control químico | 7 |
| 2.5 Control Biológico | 8 |
| 2.6 Características generales del <i>Bacillus thuringiensis</i> | 9 |
| 2.7 Patotipos | 14 |
| 2.8 Serotipos | 16 |
| 2.9 Modo de Acción | 17 |
| 2.10 Desarrollo de resistencia | 19 |
| 2.11 Producción de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 22 |

| | |
|--|----|
| 2.12 Bioensayo | 25 |
| III. MATERIALES Y MÉTODOS | 27 |
| 3.1 Colecta de los insectos | 27 |
| 3.2 Cría de los insectos | 29 |
| 3.3 Obtención del complejo espora-cristal de <i>Bacillus thuringiensis</i> | 32 |
| 3.4 Cultivo de la cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (HD-1 <i>Kurstaki</i>) | 32 |
| 3.5 Purificación del complejo espora-cristal | 33 |
| 3.6 Bioensayos | 34 |
| 3.7 Selecciones de la Colonia Sel | 36 |
| 3.8 Estudio genético | 37 |
| IV. RESULTADOS | 38 |
| 4.1 Susceptibilidad de la población colectada en el campo | 38 |
| 4.2 Resistencia de la población seleccionada en el laboratorio | 41 |
| 4.3 Estudio Genético | 45 |
| V. CONCLUSIONES | 49 |
| VI. BIBLIOGRAFÍA | 50 |

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Susceptibilidad de la población de *Plutella xylostella* de Huanimaro tratada con *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) ----- 39

Cuadro 2. Presión de selección con el complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) en el laboratorio ejercida durante 3 generaciones (Población Sel) ----- 41

Cuadro 3. Concentraciones letales medias y factor de resistencia de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) ----- 42

Cuadro 4. Cruzas y retrocruzas de las poblaciones de *Plutella xylostella* seleccionadas y no seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*)
45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones NselF1 y NselF5 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki) ----- 40

Figura 2. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF1, SelF5 y NselF5 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki) ----- 44

Figura 3. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF5, NselF5 y F1 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki) ----- 46

Figura 4. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF5, NselF5, F1 y *CR1 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki) -- 48

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de las crucíferas es considerado como uno de los sistemas-producto de mayor importancia socioeconómica en nuestro País, ya que la cosecha va destinada principalmente al mercado de exportación y representa una significativa fuente de divisas y un gran incentivo económico para los productores. Estos cultivos son de importancia social por la gran cantidad de mano de obra que generan en forma directa para las labores de la siembra, e indirectamente por el personal que se ocupa durante el proceso, empaque y transporte; tan sólo en nuestro país se producen 119, 924 toneladas. La zona de más alta producción se encuentra en la región del Bajío donde más de 20,000 hectáreas de brócoli son sembradas anualmente (INEGI, 1991).

Sin embargo, el cultivo presenta daño por el ataque de diversos organismos, en particular, la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L) (Px), que también se le conoce como oruga verde del repollo, polilla de la col, palomilla del repollo, palomilla del raps, etc., y que representa una de las plagas más nocivas para las crucíferas. En general, muestra preferencia por los cultivos de la col, brócoli, coliflor y col de Bruselas.

En México está considerada como una de las plagas mas importantes, no tanto por los daños indirectos que ocasiona sino por su demostrada habilidad para desarrollar poblaciones con resistencia a muchos insecticidas (Talekar, 1986; Tabashnik *et al.*, 1991; Shelton *et al.*, 1993a,b). El fenómeno del desarrollo de poblaciones resistentes a los insecticidas ha causado crecientes problemas para la producción durante los últimos 25 años.

Esta plaga fue registrada por primera vez en México en 1960 atacando cultivos de repollo en el Valle del Yaqui, Sonora (Carrillo *et al.*, 1966). Antes de 1988, el control de la palomilla dorso de diamante dependía principalmente del uso de insecticidas organo-sintéticos. Sin embargo, debido a los declinantes niveles de efectividad de los insecticidas convencionales, los insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* han sido usados por los agricultores en el Bajío desde 1989. Varios productos de *Bacillus thuringiensis* (Bt) que contienen una o más formas de la delta endotoxina (Höfte y Whitely, 1989) son ahora ampliamente usados y existe la preocupación de que la resistencia a una o más de las delta endotoxinas pueda ocurrir en *P. xylostella* en México, como se ha presentado en otros países (Shelton *et al.*, 1993a; Tabashnik, 1994; Pérez y Shelton, 1997).

En México, el riesgo de desarrollar resistencia a *Bacillus thuringiensis* en *Plutella xylostella* fue reportado y discutido por Ibarra (1993). Estos estudios sugieren la existencia de genes para resistencia a Bt en poblaciones de campo. Las consecuencias de la resistencia a Bt podrían ser graves y la necesidad de diseñar e implementar tácticas y estrategias para retrasar su desarrollo es extremadamente urgente (Díaz, 1999).

Los objetivos que se pretenden cubrir en esta investigación son: 1) determinar los niveles de susceptibilidad de Px, a *Bacillus thuringiensis* subespecie *kurstaki* procedentes de cultivares de crucíferas en el Bajío; 2) verificar la dominancia del gene o los genes involucrados en la resistencia, e inferir sobre el número de genes responsables de la misma.

Así surgen las siguientes hipótesis: 1) cepas de *Plutella xylostella* (L) de diferente origen geográfico muestran diferencia en susceptibilidad a la endotoxina de *Bacillus thuringiensis* porque existe variación fundamental en el régimen histórico de selección. 2) la herencia de la resistencia a *B. thuringiensis* subesp. *kurstaki* en poblaciones de *P. xylostella* (L), es incompletamente recesiva e inestable y monogénico.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Características Generales de *Plutella xylostella* (L)

La palomilla dorso de diamante es originaria de la zona del Mediterráneo, centro de origen de las más importantes especies de plantas de la familia de las crucíferas. Esta plaga está presente en todas las partes del mundo donde se cultivan crucíferas y se estima que es una especie cosmopolita.

2.2 Descripción morfológica y hábitos

La palomilla dorso de diamante es un insecto holometábolo, es decir, que pasa por los estados biológicos de huevecillo, larva, pupa y adulto. Los huevos son en forma de escama, color amarillo y miden aproximadamente 0.5 mm, estos son depositados principalmente en el envés de las hojas en forma individual o formando pequeños grupos de 2 o 3 huevecillos. Su período de incubación es de 3 a 9 días, dependiendo de la temperatura. Después de eclosionar, la larva del primer instar presenta un color amarillo blanquecino, con la cápsula cefálica oscura; se alimenta del envés de las hojas formando pequeños agujeros (Metcalf, 1966).

Las larvas maduras de cuarto instar miden menos de un centímetro de longitud y pueden ser de color verde pálido, amarillo claro o castaño oscuro con las manchas oculares negras. El último par de falsas patas se encuentra ampliamente separado formando una “ V “ invertida. Al molestarlas se retuercen rápidamente, dejándose caer para quedar suspendidas de un hilo sedoso (Metcalf, 1966).

La pupa mide de 0.5 a 0.6 cm de longitud y presenta un color amarillo claro, amarillo verdoso o verde claro con bandas longitudinales de color café oscuro. Generalmente se encuentra adherida a la parte inferior de la hoja. La pequeña palomilla emerge en el término de una semana o dos pero inmediatamente inicia otra generación (Metcalf, 1966).

Los adultos miden 10 mm de longitud y 12 a 15 mm de envergadura alar; el cuerpo es esbelto, grisáceo o café. El macho al tener las alas plegadas presenta tres manchas café claro en forma de diamante sobre el dorso, las alas posteriores son café claro y tienen flecos con largos pelos. Las hembras viven aproximadamente tres meses; depositan en promedio alrededor de 150 huevos (Metcalf, 1966).

En condiciones favorables en el campo, los huevos se desarrollan de 3 a 10 días, las larvas de 10 a 12 días y las pupas entre 7 y 14. El promedio de

tiempo generacional es de 30 días desde huevo a adulto y generalmente presenta de tres a seis generaciones por año (Metcalf, 1966).

Las larvas son las causantes del daño económico en los cultivos. Cuando éstas eclosionan, penetran las hojas ocasionando pequeñas galerías. Posteriormente salen y se alimentan del follaje dejando pequeños orificios, además, perforan el corazón y otras partes comercializables de la planta, las que pueden quedar llenas de galerías, excrementos y telillas (Metcalf, 1966).

Clasificación taxonómica

| | |
|---------------|----------------------------|
| Reino: | Animal |
| Phylum: | Artrópoda |
| Clase: | Insecta |
| Orden: | Lepidóptera |
| Suborden: | Frenatae |
| Superfamilia: | Yponomeutóidea |
| Familia: | Yponomeútidae |
| Género: | <i>Plutella</i> |
| Especie: | <i>xylostella</i> (Linneo) |

2.3 Control de la Palomilla Dorso de Diamante

Existen varias tácticas de manejo de la palomilla dorso de diamante, entre las que se incluyen: control biológico, control químico, control legal (uso de vedas) y prácticas culturales, de las cuales, las más importantes parecen ser las dos primeras.

2.4 Control químico

La estrategia para el manejo de la palomilla dorso de diamante y otras plagas de las crucíferas, se basa en el uso casi exclusivo de insecticidas y se caracteriza por un elevado número de aplicaciones. La exigencia del mercado norteamericano de brócoli sin presencia de plagas, daños de los mismos y con una calidad cosmética, ha conducido al empleo de grandes cantidades de plaguicidas para asegurar estos índices de calidad. Los insecticidas químicos ciertamente han contribuido a reducir los daños por contaminación momentáneamente, pero han generado otros serios problemas.

El uso intensivo de los insecticidas promueve el desarrollo de resistencia en las plagas, elimina a sus enemigos naturales, favorece el surgimiento de plagas secundarias, posibilita la presencia de residuos en el producto comestible y representa un riesgo para los operativos de la

tecnología de producción de cultivo, además de que ocasiona aumentos en los costos de producción.

La resistencia de las plagas a insecticidas conlleva al aumento continuo en la cantidad de ingrediente activo de varios productos necesarios para el control del insecto.

2.5 Control Biológico

Es uno de los principales componentes del Manejo Integrado de Plagas y es definido como la suma de acciones emprendidas para favorecer la acción de parásitos, depredadores y patógenos en el control de un insecto-plaga, e incluye toda una estrategia del manejo racional de insecticidas, donde los productos biológicos son una parte importante. El combate biológico puede ser realizado en forma natural y/o inducido y consiste en el manejo de las poblaciones de la plaga utilizando a sus enemigos naturales.

Dentro de los patógenos de insectos más utilizados en la entomología económica, la bacteria formadora de esporas *Bacillus thuringiensis* es el agente de control más común. Ésta bacteria se encuentra en el 95% de los insecticidas microbianos producidos a nivel mundial y su aplicación en cultivos agrícolas ha presentado un crecimiento exponencial en los últimos años (Ibarra, 1993).

2.6 Características generales del *Bacillus thuringiensis*.

De los cinco grupos de entomopatógenos más conocidos y desarrollados, las bacterias son las más importantes, y dentro de éstas, Bt tiene un lugar preponderante. A pesar de que existen otras especies entomopatógenas importantes dentro del mismo género (*B. popilliae*, *B. sphaericus*, *B. larvae*), Bt es la bacteria entomopatógena más conocida, más estudiada y la más extensamente utilizada como agente de control microbiano. Más del 90% del mercado de bioinsecticidas es cubierto con productos a base de ésta bacteria, de ahí su importancia. Aún así, los productos a base de Bt no llegan a constituir ni el 2% del mercado de insecticidas; sin embargo, se estima que ésta proporción podría incrementarse a 5-10% en los próximos tres años (Glare y O'Callaghan, 2000 citados por Ibarra (2000)).

Al igual que el resto de las especies del género *Bacillus*, Bt es una bacteria aeróbica, gram positiva, móvil y posee una endospora como estructura de resistencia. Las células vegetativas tienen forma de bastón de 2 a 5 x 1 µm, y presentan flagelos peritricos. Se dividen por fisión binaria y frecuentemente se les encuentra creciendo en cadena. Es un microorganismo ubicuo del suelo, del cual se aísla con bastante frecuencia y presenta una distribución cosmopolita (Andrews *et al.*, 1987). Su nicho específico no ha

podido ser determinado con exactitud, se le asocia con ambientes edáficos. Su capacidad patogénica es ocasional en condiciones naturales ya que no se presenta como un factor biótico determinante en la fluctuación natural de las poblaciones de los insectos susceptibles. Tampoco se le considera un factor causante de epizootias naturales, aún después de una aspersión en el campo. Es por esta razón que su relación coevolutiva con los insectos susceptibles, como existe en muchos otros agentes de control biológico, sea controversial.

La característica principal de Bt es que, simultáneo a la formación de la espora, produce un cuerpo de naturaleza proteica denominado cristal o cuerpo parasporal.

La gran mayoría de los productos contienen como ingrediente activo al complejo espora-cristal, que constituye el producto final del proceso de fermentación de ésta bacteria.

El descubrimiento de Bt se remonta a 1901, cuando el japonés Ishiwata la aisló de una larva enferma del gusano de la seda. Sus pruebas preliminares demostraron su alta capacidad insecticida por lo que la llamó “sotto bacillus” (“sotto” significa muerte súbita, en japonés). También destacó la presencia de un cuerpo romboidal al lado de la espora. Sin embargo, no fue sino hasta 1915, en Alemania, cuando Ernst Berliner aisló ésta misma bacteria a partir de larvas de la palomilla de los graneros *Ephestia kühniella* y la describió

apropiadamente, denominándola *Bacillus thuringiensis*, en honor a la provincia alemana (Thüringen o Turingia) de donde se colectaron dichas larvas.

A pesar de que se hicieron algunos ensayos de campo y de que en 1938 se produjo en Francia un insecticida llamado "Sporeine" a base de ésta bacteria, no se llevaron a cabo otros estudios básicos más que los realizados por los investigadores japoneses relacionados con su descubrimiento y los de Otto Mates en Alemania (Andrews *et al.*, 1987 y Rowe y Margaritis, 1987). En 1951, Edward Steinhaus la rescató de su colección de bacterias para realizar pruebas de campo sorprendentemente exitosas.

Durante la década de los 50's, investigadores canadienses lograron correlacionar la presencia del cristal o cuerpo parosporal con la toxicidad, e iniciaron su caracterización morfológica y bioquímica. Su desarrollo biotecnológico fue tan acelerado que en 1960 ya estaba en el mercado estadounidense un bioinsecticida a base de esta bacteria para el control de algunos lepidópteros.

Durante las décadas de los 60's y 70's, la producción de Bt tuvo algunos altibajos, iniciándose un repunte a principios de los 80's y un auge en la segunda mitad de ésta misma década, hecho que aún no culmina y que ha sido impulsado por el descubrimiento de dos nuevos patotipos: uno en 1976,

activo contra mosquitos, y otro en 1982, activo contra coleópteros. Hasta la fecha se conocen más de 100 productos comerciales, y existen planes, por parte de diversas compañías, para expandir el mercado.

Adicionalmente, los estudios básicos sobre la genética de ésta bacteria han permitido la utilización de los genes que codifican las toxinas, en la transformación de plantas resistentes a insectos susceptibles.

En México, Bt se ha aplicado contra pocas especies de insectos plaga, comparado con los insecticidas convencionales, quizá debido a su estrecho rango de actividad, corta persistencia en campo, y probablemente su costo. Sin embargo, existen plagas agrícolas que en algunos cultivos y zonas han recibido aplicaciones considerables de este bioinsecticida, tales como: la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (L.) y el gusano falso medidor *Trichoplusia ni* (H.) sobre crucíferas, en el Bajío; los gusanos alfiler *Keiferia lycopersicella* W., del fruto *Helicoverpa zea* B. y soldado *Spodoptera exigua* (H.), sobre soya en Sonora. Bt también se ha utilizado para el control de insectos de importancia médica como mosquitos de los géneros *Culex* y *Aedes*, en Nuevo León y en algunos centros turísticos. A nivel experimental, se ha usado para controlar plagas del género *Diatraea* sobre maíz en el estado de México. Éstas aplicaciones, excepto las de maíz, han empezado a ejercer una presión de selección suficientemente grande como para que se esperen

cambios importantes en la frecuencia de genes de resistencia en campo que pudieran conllevar, en el mediano plazo, al desarrollo de resistencia a éste importante insecticida biológico (Georghiou, 1972 y 1990; Vázquez-García, 1983).

En la región del Bajío, México, Bt se ha usado de manera extensiva desde 1989 debido a las exigencias de calidad del mercado internacional y a la problemática que enfrentan los productores para controlar la palomilla dorso de diamante con insecticidas organosintéticos (Laborde, 1992).

Considerando lo anterior y la importancia que tienen las toxinas de Bt para la producción agrícola en México, el diseño e implementación de estrategias que permitan su uso sustentable representa un reto para los investigadores de instituciones de investigación y universidades, gobierno, industria de agroquímicos y productores. Por lo tanto, y dado el creciente potencial que existe por utilizar Bt en nuestro país, es impostergable iniciar un análisis de las posibles estrategias de uso de éste producto en el control de plagas. Asimismo, es imperativo planear posibles estrategias que reduzcan la presión de selección que actualmente se hace, para manejar los casos con el más alto riesgo de resistencia probados y documentados, como en el Bajío con la palomilla dorso de diamante.

2.7 Patotipos.

Como se mencionó anteriormente, los cristales están constituidos de proteínas denominadas Cry (protoxinas), las cuales al ser activadas (δ -endotoxina) actúan como venenos estomacales contra una gran variedad de insectos, principalmente dentro de los grupos de lepidópteros, dípteros y coleópteros. Las proteínas Cry tienen masas moleculares que van de 70 hasta 140 kDa y están presentes en diferentes subespecies de Bt, sin importar su distribución geográfica. La gran mayoría de los serotipos, variedades y cepas conocidas presentan un cristal bipiramidal, con cierta variación de tamaño y forma. Éste cristal normalmente presenta toxicidad a una gran diversidad de larvas de lepidópteros, incluyendo a un número significativo de plagas agrícolas. Este es el llamado patotipo I (Federici, 1993); el cuerpo parasporal, sin embargo, varía en su forma al variar el patotipo. Es decir, que las cepas que presentan alta toxicidad hacia mosquitos y jejenes, muestran un cristal irregular en su forma, aunque tiende a la esfericidad.

Un aspecto distintivo de este tipo de cristal es la complejidad de su ultraestructura, ya que se encuentra formado por 3 o 4 inclusiones diferentes, correspondientes a las distintas proteínas que lo componen. Éste es el llamado patotipo II, que fue aislado por primera vez en 1976 en Israel (Federici *et al.*,

1990). El último patotipo (patotipo III) fue descubierto en 1982 en Alemania, y su rango de actividad se restringe a algunas especies de coleópteros, principalmente crisomélidos. En este patotipo, el cristal muestra una forma cuadrada y aplanada, similar a la de un cojinete delgado. No presenta inclusiones internas y la proteína que lo conforma es de aproximadamente la mitad del peso molecular de los otros dos patotipos (Krieg *et al.*, 1983).

La diferencia en toxicidad depende del tipo de delta endotoxina. Es preciso aclarar que, aunque normalmente se hace referencia a “la δ -endotoxina de Bt”, en realidad se conocen hasta esta fecha un total de 178 diferentes δ -endotoxinas, las cuales recientemente se han clasificado como proteínas Cry de la 1 a la 28, éstas, a su vez, se dividen en subgrupos que también pueden subdividirse (Höfte y Whiteley, 1989; Crickmore *et al.*, 1998).

Cada grupo presenta no sólo una estrecha homología a nivel de la secuencia de sus aminoácidos (y consecuentemente, de las bases nitrogenadas de sus genes denominados Cry), sino de su especificidad que normalmente también es compartida con los Cry del mismo grupo.

Algunas cepas de Bt pueden producir varias proteínas Cry, relacionadas o no, lo que puede ampliar el rango o el nivel de actividad de éstas cepas. De la misma forma, una especie insectil puede ser susceptible a varias proteínas Cry (principalmente dentro de los lepidópteros), pero normalmente muestra

diferentes grados de susceptibilidad a cada una de ellas (Höfte y Whiteley, 1989).

Cabe hacer mención que algunas compañías han mostrado cepas con actividad hacia otros tipos de insectos (hormigas, áfidos, etc.) y no insectos (nematodos, ácaros, platelmitos, etc.), las cuales, deberían considerarse como nuevos patotipos, pero desafortunadamente no han demostrado su verdadera efectividad con datos contundentes.

2.8 Serotipos.

En la actualidad existe una gran cantidad de cepas de Bt, aisladas de muy diversas partes del mundo. Con el objeto de diferenciar los diversos aislamientos, se ha tratado de establecer los parámetros que ayudarían a discriminar una cepa de otra. Uno de estos parámetros consiste en la serotipificación. Ésta técnica se basa en la reacción cruzada de las proteínas flagelares de Bt contra los anticuerpos producidos a partir de las cepas tipo (De Barjac y Bonnefoi, 1962).

Hasta la fecha se conocen 70 grupos; sin embargo, debido a que algunos presentan subgrupos (ejemplo H-3a3b3c; H-6a6c, etc.), el número de serovariedades es mayor (83). A su vez, a cada serotipo corresponde un

nombre de tal forma que los diferentes subgrupos de Bt se reconocen más ampliamente por su tercer apelativo.

Así, el serotipo H-3a3b3c corresponde a la serovariedad *kurstaki*, el serotipo H-14 corresponde a la serovariedad *israelensis*, y así sucesivamente.

Desafortunadamente, en los últimos años ésta técnica ha sido cuestionada debido a su ineficiencia, por un lado, para diferenciar cepas con características diametralmente opuestas (diferente patotipo, diferente tipo de cristal, diferente patrón de plásmidos, etc.), y por otro, para incorporar en un solo serotipo a cepas de reconocida similitud. Por esta razón, en los últimos años se ha tratado de desarrollar herramientas moleculares que permitan no sólo la discriminación entre cepas, sino el establecimiento de la relación evolutiva entre ellas.

2.9 Modo de Acción.

Bt necesita ser ingerido por el insecto para que lleve a cabo su efecto tóxico. Ésta bacteria no tiene la capacidad de invadir a su hospedero; al ingerirse el complejo espora-cristal, los cristales se disuelven en el mesenterón debido a su contenido altamente alcalino. Una vez disueltos, las proteínas del cristal (protoxinas) sufren proteólisis por las proteasas digestivas del insecto; sin embargo, su degradación no es completa, quedando intacta una proteína de

aproximadamente 65 kD. Ésta es la toxina activa llamada δ -endotoxina, la cual adquiere una conformación tridimensional que le confiere gran especificidad para acoplarse a un componente glicoproteico de la membrana de las células epiteliales, comúnmente llamado “receptor” (Gill et al., 1992).

Recientemente se ha logrado dilucidar la naturaleza del receptor para la proteína Cry1A(c) en el gusano de cuerno del tabaco *Manduca sexta*, el cual es una glicoproteína de 120 kD que presenta una gran similitud con la enzima aminopeptidasa N (Powell et al., 1995). Ésta unión desequilibra la estructura de la membrana y “abre” un poro por el cual penetran cationes (principalmente K⁺) seguidos de agua. El exceso de agua en el citoplasma de las células epiteliales provocan una distensión excesiva de los organelos membranosos, y de la propia célula en su totalidad hasta que ésta estalla (proceso denominado lisis osmóticocoloidal). Unas pocas células dañadas podrían ser reemplazadas rápidamente por otras nuevas, sin que ocurran consecuencias fatales; sin embargo, cantidades suficientes de δ -endotoxina normalmente destruyen amplias áreas del epitelio, las cuales se manifiestan en huecos por donde pasa el contenido altamente alcalino del mesenterón hacia la hemolinfa (que presenta un pH casi neutro), y la hemolinfa hacia el lumen del mesenterón. Estos dos fenómenos traen consigo consecuencias dañinas para el insecto. Por un lado, al aumentar el pH de la hemolinfa, la conducción

nerviosa cesa y la larva se paraliza. Por otro lado, la larva deja de comer lo cual conduce a la muerte por inanición en 4 o 5 días; por otro lado, al disminuir el pH del contenido estomacal, crea un ambiente favorable para la germinación de las esporas ingeridas junto con los cristales, iniciando la proliferación de las bacterias en el individuo paralizado, pudiendo sobrevenir la muerte por septicemia, o por la combinación con el efecto tóxico (Gill *et al.*, 1992).

A pesar de que las larvas muertas contienen gran cantidad de esporas y cristales debido a que proliferan en los cadáveres, éstas normalmente no representan focos de infección para otros individuos. Además, en el cadáver se presentan mayormente otras bacterias saprofitas, las cuales compiten con Bt.

2.10 Desarrollo de resistencia.

A partir de 1953, la palomilla dorso de diamante fue el primer insecto-plaga de cultivos agrícolas en el mundo que desarrolló resistencia hacia el DDT. La mayoría de los insecticidas organosintéticos son neurotóxicos con actividad por contacto, un modo de acción muy diferente a la actividad intestinal de las delta endotoxinas de Bt, que requieren ser ingeridas y activadas. Por lo tanto, teóricamente, el mecanismo de resistencia a Bt podría ocurrir en cualquiera de los siguientes eventos: ingestión, disolución del cristal

o inclusiones, activación de las protoxinas, el paso de la toxina a través de la membrana peritrófica, enlace de la toxina al epitelio del intestino medio, o en el rol de la toxina en la formación del poro en la membrana del intestino medio. Además, el comportamiento de los insectos puede jugar un papel importante en el desarrollo de resistencia de algunas especies (Stone *et al.*, 1991). Van Rie *et al.* (1990) y Ferre *et al.* (1991) describieron el mecanismo de resistencia en *Plodia interpunctella* y *Plutella xylostella* respectivamente, coincidiendo en señalar que el mecanismo es bioquímico, esto es, que ocurre un cambio en la membrana intestinal la cual disminuye la concentración de receptores, o la afinidad de enlace de las toxinas en el intestino de los insectos.

En el control biológico existe un tópico, el cual es uno de los más controvertidos sobre el uso de plantas transgénicas que constituye la posibilidad de que las plagas desarrollen resistencia hacia las δ -endotoxinas.

En otras palabras, una de las ventajas de los bioinsecticidas a base de Bt es precisamente la lentitud o incapacidad de las plagas susceptibles a desarrollar dicha resistencia; sin embargo, ahora se cree que esto se debe principalmente al hecho de que estos productos se degradan rápidamente en el medio, eliminándose la presión continua de selección, que es un factor clave para el desarrollo de resistencia hacia otro tipo de insecticidas.

El primer caso probado de resistencia a Bt fue el reportado en la palomilla de los graneros, *Plodia interpunctella* (McGaughey, 1985). Se cree que esto fue motivado por las condiciones cerradas del granero, las cuales permiten mantener activo al producto por un período más largo y de esta forma, efectuar una presión de selección más duradera. Es también importante aclarar que los volúmenes usados de estos productos, comparativamente con los de los insecticidas sintéticos, son muy reducidos; sin embargo, su uso se ha incrementado grandemente en los últimos 20 años, y es en este período en que han aparecido reportes de resistencia en el campo sobre otras plagas. Recientemente, la palomilla dorso de diamante fue la primera especie en manifestar resistencia de campo hacia el insecticida microbiano Bt (Tabashnik *et al.*, 1990). Ha sido el caso más documentado sobre el desarrollo de resistencia a Bt en diversas partes del mundo (Tabashnik *et al.*, 1991). A pesar de que existen otros casos, éste es el único que se ha desarrollado bajo condiciones de campo, debido a un uso inmoderado de bioinsecticidas a base de Bt. Los otros casos (mosquitos, catarinita de la papa, otros lepidópteros, etc.), se han desarrollado bajo condiciones de laboratorio y/o con niveles de resistencia poco significativos. El desarrollo de resistencia hacia Bt es rápidamente reversible a los niveles originales de susceptibilidad, cuando se elimina la presión de selección de la toxina (Vázquez-García, 1983)

Tomando en cuenta éstas evidencias, las plantas transgénicas presentarían una situación óptima de selección continua, ya que la toxina se expresaría siempre que el fitófago se alimentara de la planta. A pesar de éstas evidencias, sería precoz y falto de seriedad prever el fracaso de esta estrategia. Su potencialidad continúa siendo de las más altas dentro de las alternativas que el manejo integrado de plagas ofrece.

2.11 Producción de *Bacillus thuringiensis*

Es difícil abordar el tema sobre la producción industrial de Bt, dado la limitada cantidad de literatura disponible. Del total de artículos publicados sobre ésta bacteria, menos del 2% cubren aspectos relacionados a su producción, y de éstos, la gran mayoría son de instituciones de investigación de países subdesarrollados o aquellos que pertenecían al bloque soviético. Esto implica que los avances tecnológicos más importantes sobre la producción de Bt se realiza en las grandes compañías productoras y en un ambiente de secrecía muy difícil de penetrar.

La decisión de producir de una a varias cepas de Bt debe haberse basado en una selección previa de cepas altamente tóxicas. Bt es una bacteria muy ubicua, que se puede aislar de una gran diversidad de hábitat; sin embargo, la posibilidad de que las cepas aisladas posean una alta capacidad insecticida es

muy baja. De ahí que cualquier programa de producción de Bt debe iniciarse con la selección de la o las cepas más apropiadas para su uso.

La producción para la comercialización de Bt, hasta el año de 1970, se basaba principalmente en la utilización del serovar *thuringiensis*; sin embargo, con el descubrimiento de la cepa HD-1 (serovar *kurstaki*), la cual es 16 veces más efectiva contra *Heliothis virescens*, muchas de las compañías productoras decidieron utilizar a ésta última como el ingrediente activo de sus productos (Andrews *et al.*, 1987; Rowe y Margaritis, 1987).

En la actualidad se ha diversificado ampliamente el número de cepas y serovariedades utilizadas en los productos a base de Bt, las cuales presentan mayor toxicidad que las cepas anteriores o han diversificado su rango de hospederos.

Los bioinsecticidas a base de Bt se producen en gigantescos fermentadores (biorreactores), cuyos medios artificiales se basan en el uso de diversas materias orgánicas baratas (ejem. harina de soya, sangre en polvo, harina de semillas de algodón, etc.), aunque la formulación completa de cada medio representa un secreto de cada compañía. Una vez que la fermentación ha llegado a su fase de autólisis (cuando la pared del esporangio se degrada y libera a la spora y al cristal, separadamente), el fermento se concentra por centrifugación y/o por secado atomizado. Este concentrado se homogeniza, se

estandariza (normalmente por bioensayos, para determinar la actividad de cada lote de fermentación), y se formula de acuerdo a su presentación comercial (polvo humectable, suspensión, gránulos, croqueta, etc.).

Normalmente la concentración de los productos a base de Bt varía entre 2 y 10%, dependiendo de la actividad de la cepa y de la potencia que se requiera del producto (Andrews *et al.*, 1987; Rowe y Margaritis, 1987). Su formulación normalmente permite el uso del equipo convencional para su aplicación. Existen algunas reglas básicas para el uso eficiente de los productos a base de Bt, como son su aplicación: 1) en horarios de poca incidencia solar (por la tarde); 2) sobre poblaciones iniciales y de los primeros instares larvarios; y 3) amplia y bien distribuida, ya que las larvas deben ingerir el producto.

Como se mencionó anteriormente, Bt muestra actividad contra un gran número de larvas de lepidópteros, contra larvas de mosquitos, jejenes y algunas especies de coleópteros.

La especificidad que muestra contra estos insectos representa una de las grandes ventajas de este bioinsecticida, ya que es completamente inocuo a otro tipo de insectos, especialmente los benéficos. De ésta forma, su eficiencia en el manejo integral de plagas es muy alta. Asimismo, existe un cúmulo de evidencias que certifican su inocuidad hacia vertebrados (incluyendo al

hombre), lo cual hace de Bt, junto con su inocuidad al medio ambiente, una de las alternativas ecológicas más atractivas (Entwistle *et al.*, 1993).

2.12 Bioensayo

El bioensayo se puede definir como “cualquier método que mida alguna propiedad de un factor, en términos de respuesta biológica”. Es decir, que el bioensayo toma a los organismos vivos como aparatos de medición, y establece el parámetro biológico que utilizará (mortalidad, longevidad, fertilidad, crecimiento, atracción, etc.) para relacionar el fenómeno causal con el efecto sobre el organismo (Busvine, 1971).

En el aspecto toxicológico, el factor causal es siempre un agente deletéreo y el efecto normalmente es la mortalidad o algún otro daño biológico.

Los bioensayos con *Bacillus thuringiensis* pueden perseguir tres objetivos diferentes, a saber:

- a) determinación del nivel de toxicidad de una cepa nueva o transformada, un producto formulado, o los cristales puros de alguna proteína específica, sobre una población de insectos.
- b) determinación de la susceptibilidad de diferentes razas o especies de insectos a una cepa determinada de *B. thuringiensis*.

c) cuantificación de la actividad de los productos de fermentación de *B. thuringiensis*, como método de estandarización de los lotes comerciales.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Colecta de los insectos

Se colectó palomilla dorso de diamante (*Plutella xylostella* L.) en campo, particularmente en el predio de Santa María, localizado en el municipio de Huanímaro Gto., localizado aproximadamente a 30 kilómetros al sureste de la ciudad de Irapuato en el estado de Guanajuato. Tiene por coordenadas geográficas 20° 40' 28'' de latitud norte y 101° 20' 51'' de longitud oeste, con una altura sobre el nivel del mar de 1,724 metros.

Ésta localidad destaca por ser de clima semicálido subhúmedo, contando con una temperatura media anual de 19.6°C, el mes que registra una máxima precipitación pluvial es el de agosto con 614.5 milímetros, el mes más cálido se registra en mayo con valor de 24°C, mientras que el más frío es el de enero con un valor de 15.2°C. Con estos datos se dan condiciones ideales para la siembra de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*), coliflor, espárragos, fresa, además de otro tipo de hortalizas. Ésta zona es productora de crucíferas en ese estado, además, de ser representativa del efecto del uso extensivo de Bt en el mismo.

Se obtuvo una población de insectos de 30,000, en su estado de larva y pupa. Esta cantidad fue colectada para contar con una buena diversidad genética de la población ya que sólo así se podría garantizar una mayor probabilidad de encontrar individuos con genes mutantes, además de compensar la mortalidad por el traslado, reproducción y cría de los individuos.

Se usaron dos recipientes de vidrio, uno para la colocación de larvas y otro para las pupas. En el primero se colocó una hoja del cultivo (brócoli) que se colectó del mismo. Posteriormente, con la ayuda de un pincel delgado se procedió a retirar a los individuos encontrados en el envés de la hoja y enseguida se depositaron dentro del envase que contenía hojas de coliflor limpio procedente de un invernadero en perfecto aislamiento. En el segundo recipiente se colocaron únicamente pupas sin hoja del cultivo y se taparon para después cambiarlas a un depósito de vidrio de 12 cm de diámetro por un centímetro de alto, para introducirlo luego en una jaula de emergencia de adultos. Las larvas se cambiaron a cajas de plástico de 18.6 cm de diámetro por 7.9 cm de altura. A la tapa se le hizo un orificio para que tuvieran ventilación y se le puso un trozo de tela organza para garantizar que no se fugaran. A éstas se les introdujo una bola de papel toalla para evitar la

acumulación de humedad. Fue necesario esperar unos días para que las larvas estuvieran en estado de pupa para introducir las en la jaula.

Las pupas se colocaron en cajas de Petri, y una vez dentro de la jaula de emergencia, se dejaron abiertas para que en su momento empezaran a emerger los adultos.

3.2 Cría de los insectos

Las jaulas fueron construidas con armazones de madera, en donde cinco de sus caras fueron forradas con tela de mosquitero y a la base del piso se le colocó una tabla de triplay delgado. En una de sus caras se adaptó una ventana a la cual se le colocó una manga de tela de organza para facilitar los movimientos de introducción y retiro de la planta de brócoli sanas e ingreso de alimento, además de colocar las nuevas pupas que se retiraban de las hojas y plántulas.

Las jaulas midieron 45 cm de ancho, 60 cm de largo por 50 cm de alto. Las de la ventana para la colocación de la manga de tela, 20 cm por 18 cm y la manga de 50 cm de largo.

La reproducción del insecto se llevo a cabo en una cámara de cría que se asignó para ésta investigación en el Laboratorio de Entomología.

La cámara se preparó de manera que se simulara condiciones de campo en donde el insecto se desarrolla. La temperatura dentro de ésta se mantuvo estable a 28°C con ayuda de un calefactor móvil y cerca de éste se colocaron dos cubetas; una de ellas contenía agua la cual se puso en la parte alta y la que no tenía líquido abajo, en el piso. Una franela se sumergió en la cubeta superior y el otro extremo se acomodó de manera que quedó centrado en el recipiente de abajo, el agua bajó por efecto de la gravedad por la franela. El calefactor se apuntaba hacia la franela húmeda y al salir el calor se lograba una humedad constante de 50%, satisfactoria para el ambiente requerido. Se tuvo un fotoperíodo de 13 horas luz y 11 de oscuridad.

En cada jaula se colocaron de 2 a 3 vasos con plántulas de brócoli sembradas en un vivero libre de plagas e insecticidas. Los adultos que emergían de la pupa inmediatamente se aparearon y empezaron a depositar huevecillos sobre éstas. La alimentación de los adultos se llevó a cabo colocando en unos recipientes pequeños una solución acuosa azucarada al 10%, además de un trozo de algodón para que la mezcla se impregnara y le facilitará la ingestión al insecto.

Las larvas en estado avanzado de maduración fueron separadas para mantenerse en observación y cuando aparecieron las primeras pupas fueron retiradas con el pincel y se colocaron en una caja de Petri y así se introdujeron

en la jaula correspondiente. Con lo anterior se logró en primera instancia relajar la presión de selección sobre la población durante una generación después de la obtenida del campo. Una vez obtenida la población F2 se procedió a realizar el primer bioensayo para determinar la Concentración Letal Media (CL₅₀) de referencia del cristal Cry1A de *Bacillus thuringiensis*. Después de lo anterior se iniciaron las selecciones durante 3 generaciones, F3, F4 y F5, consecutivas, al final de las cuales se inició el estudio de la herencia del mecanismo de resistencia.

Para la realización del estudio genético fue necesario separar hembras y machos por el color de los rombos del dorso y las alas. Los machos tienen las alas de color negro con los tres rombos bien definidos en el dorso y con un color blanco brillante, por el contrario, la hembra es parda y no presenta los tres rombos definidos en el dorso, además de un color tenue. Para esto, se colocó en un recipiente pequeño una pupa y en seguida se tapó con papel transparente para facilitar la maniobra. Una vez emergidos los adultos se introdujeron por cinco minutos en un refrigerador con una temperatura de menos 2°C. Lapso de tiempo durante el cual el insecto quedó inmóvil. Posteriormente se observó bajo el microscopio, campo de observación en donde se determinó su sexo. Enseguida se colocaron dentro de pequeñas jaulas para hacer las cruces necesarias.

Las pequeñas jaulas para éste estudio se construyeron de madera, rectangulares forradas con tela de organza. Las medidas fueron de 30 por 30 y 40 cm de largo, en una de las cara se le adaptó una manga con la finalidad de poder ingresar a los insectos.

3.3 Obtención del complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis*

La cepa de *B. thuringiensis* (HD-1) *Kurstaki* se obtuvo del Laboratorio de Bioinsecticidas del Departamento de Biotecnología y Bioquímica del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, con sede en la ciudad de Irapuato, Guanajuato, México.

3.4 Cultivo de la cepas de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *Kurstaki*)

La cepa Bt se cultivó en un medio líquido, el cual se preparó con leche peptonizada, colocando 50 mL en un matraz de 250 mL y después con unas pinzas esterilizadas se tomó una tira de papel impregnada de la cepa (inóculo) y se introdujo en el matraz con el medio de cultivo. Una vez dentro se agitó para que se liberaran las esporas. Enseguida se retiró el papel para evitar su desintegración y se desechó.

3.5 Purificación del complejo espora-cristal

El cultivo de Bt creció en medio con leche peptonizada y se agitó a 340 rpm y 28°C durante 96 hrs para obtener la esporulación. El complejo espora-cristal (HD-1 *kurstaki*) se precipitó por centrifugación a 10,000 rpm y 15°C por 15 minutos. Por último se lavó tres veces con agua destilada.

Los cristales se separaron de las esporas y restos celulares a través de centrifugación en gradiente discontinuo de sacarosa. El gradiente que se utilizó fue de 59, 63, 67, 71, 75 y 79 % y se necesitaron tubos de polialomero de 32 mL (Beckman). Se resuspendió en un volumen de 50 mL de agua destilada, luego se colocaron cuidadosamente 3 mL de la suspensión sobre la capa superior del gradiente para evitar romper el mismo.

Las condiciones de la ultracentrifugación fueron las siguientes: 20, 000 rpm, 1 hr, 40°C, y se realizó en un rotor de columpio Sorvall HD-674.

Las bandas que se obtuvieron después de la centrifugación se colectaron con Pipetas Pasteur en tubos por separado. Cada capa se analizó en el microscopio de contraste de fases, a fin de detectar la que correspondía a la de los cristales. Una vez que se detectó la capa, se lavó tres veces con agua destilada sometiéndola a una centrífuga de 15, 000 rpm a 4°C, por 15 minutos

con la finalidad de quitarle los restos de sacarosa. La pastilla resultante, se congeló y posteriormente se liofilizó.

3.6 Bioensayos

Una vez obtenido el complejo espora-cristal (HD-1 *kurstaki*) de *Bacillus thuringiensis* se procedió a preparar las soluciones que se aplicaron en el bioensayo. Éste se llevó al cabo en tres repeticiones y utilizando un número mínimo de veinte larvas de segundo instar por dosis. Por separado se hizo una mezcla de Tween 80 estéril con agua destilada para obtener una solución al 0.02 %.

Posteriormente se pesaron 10 mg del complejo de Bt en polvo con una balanza de precisión analítica modelo XT220A, de la marca PRECISA y se diluyeron en 10 mL de la mezcla de Tween al 0.02 %, obteniendo así una solución madre de 1,000 ppm. Posteriormente se procedió a realizar diluciones seriadas según el bioensayo. Por cada repetición se usaron un mínimo de cinco dosis y un testigo. Las dosis se aplicaron sobre 5 larvas de segundo instar por repetición, por lo que en las tres repeticiones se trataron un total de 15 larvas como mínimo. Se utilizó el método de inmersión de trozos de hoja de coliflor sana y libre de contaminación, previamente agitada con metanol o acetona para eliminar la capa cerosa y lograr una impregnación adecuada. Se hizo una

agitación leve con Vortex para mejorar la impregnación. A cada una de las 5 larvas se les colocó un segmento de hoja de aproximadamente 1 cm². Los segmentos de hoja ya tratados con las dosificación respectivas y secados por 1 hr se colocaron en una caja de Petri estéril por dosis con un círculo pequeño de papel filtro whatman no. 4 humedecido con agua destilada para que el trozo de hoja mantuviera su humedad durante el tiempo requerido. Las cajas de Petri se taparon mediante papel toalla para evitar la fuga de las larvas. Al testigo solamente se le pusieron las larvas con su segmentos de hoja sin aplicar el Bt, pero igualmente tratada para eliminar la capa de cera. La mortalidad se registró a las 48 horas después de iniciar la alimentación de las larvas con el trozo de hoja tratada.

Se determinó el rango de respuesta de la población de F1 (hijos de la población colectada en campo) y la respectiva Concentración Letal Media (CL₅₀). Posteriormente, la colonia se dividió en dos partes. Una de ellas para realizar selecciones y la otra sin seleccionarla para guardarla como referencia o testigo. En la colonia para selecciones (Sel) se hicieron bioensayos solamente en la generación F1 y F5. Lo mismo se repitió en la colonia no seleccionada (Nsel). Todos los datos de bioensayo se sometieron al análisis estadístico Probit para determinar la línea ldp (logaritmo-dosis-probit) y su ecuación correspondiente, mediante un programa de Análisis Probit, SPSS

para WINDOWS, Dic. 19, 1995 versión 7.0. De acuerdo con Finney (1952) se consideraron líneas de respuesta (ldp) significativamente diferentes cuando no existieron traslapes en los límites fiduciales del nivel medio de mortalidad (CL_{50}).

3.7 Selecciones de la Colonia Sel

Una vez obtenida la dosis letal media en F1 y dividida la colonia, se procedió en una de ellas a la selección. Para seleccionar se colocaban repetidamente en un recipiente de plástico grande, de medidas 40 x 40 y 10 cm de alto, un número de entre ochenta y cien larvas de segundo instar en trozos grandes de hoja de coliflor tratadas con la CL_{70} respectiva con Bt en un contenedor con papel filtro del No. 5 de 110 mm de diámetro al que se le agregó agua destilada para que los trozos mantuvieran humedad y duraran en buen estado las horas requeridas. Después de 48 horas de exposición, las larvas que sobrevivieron se separaron y se les asignó una nueva jaula para su multiplicación con su rotulo SelF1, SelF2, SelF3 y SelF4. Las selecciones se suspendieron en F5 luego de tener un incremento de la CL_{50} mínimo suficiente para el estudio genético.

3.8 Estudio genético

Se realizó una cruce de (hembra) Self5 x NSelf5 (macho) y la descendencia F1(Self5 x NSelf5) fue sometida a bioensayo para determinar la línea ldp (log-dosis-probit) y con ella inferir sobre el grado de la dominancia del carácter "resistencia al complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*)". Posteriormente se hizo la retrocruza (machos) F1(Self5 x NSelf5) x Self5 (hembras) y la descendencia nuevamente sometida a bioensayo para determinar la ldp y con ella inferir sobre el número de genes involucrados en la manifestación de "resistencia al complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*)" de acuerdo al procedimiento de Abedi y Brown (1960).

IV. RESULTADOS

4.1 Susceptibilidad de la población colectada en el campo

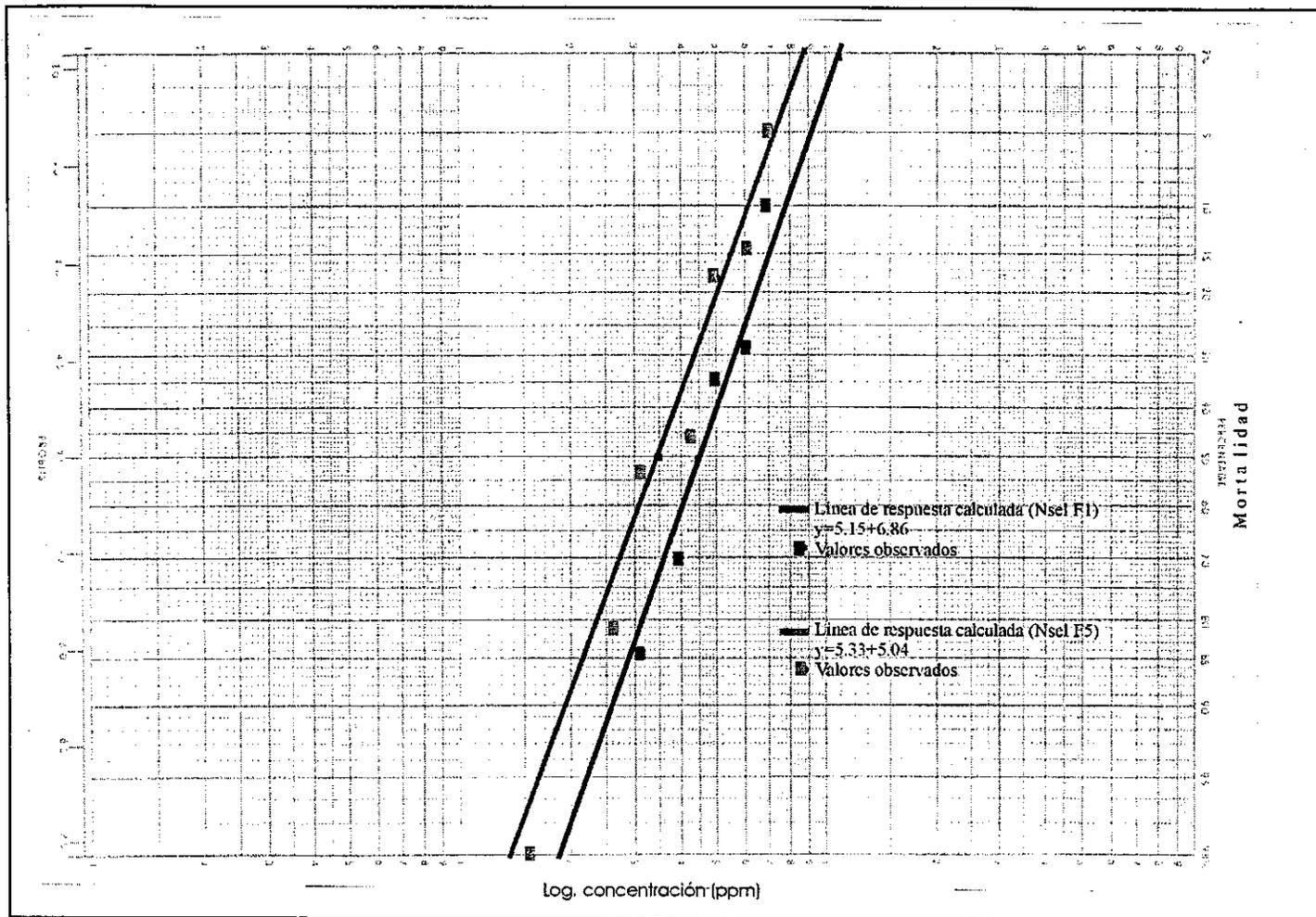
La población NselF1 (la siguiente generación después de colectada) de larvas de *Plutella xylostella* colectada en Huanímaro, Guanajuato mostró una CL_{50} de 0.46 ppm del complejo espora-cristal *Bacillus thuringiensis* subesp. *Kurstaki* (HD-1) (Cuadro 1 y Figura 1). Éste valor comparado con el obtenido en la población NselF5 (0.35 ppm) corresponde a un factor de resistencia (FR) desarrollada en el campo de 1.24X, lo cual sugiere que el relajamiento de la presión de selección (la ejercida por las aplicaciones históricas en el campo) durante las 4 generaciones sin seleccionar en el laboratorio, sí conduce a una pequeña pero rápida recuperación de la susceptibilidad original al Bt. Éste resultado coincide con lo reportado por Díaz (1999) donde sugiere utilizar una concentración discriminante de 0.42 ppm, ya que ésta puede clasificar la susceptibilidad de las poblaciones de campo, además de predecir la utilidad potencial de las toxinas de Bt subesp. *kurstaki*.

Cuadro 1. Susceptibilidad de la población de *Plutella xylostella* de Huanimaro Guanajuato, tratada con *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*). 2002.

| Población | CL ₅₀ ppm (95% LF) | CL ₉₀ ppm (95% LF) | Pendiente +/- SE | X ² | FR |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------|-------|
| Huanimaro (Nsel F1) | 45.25(41.74-48.74) | 69.58(62.90- 80.79) | 6.86+/-0.85 | 4.19 | 1.24 |
| Nsel F5 | 34.48(29.66-38.61) | 61.86(53.41- 79.69) | 5.04+/-0.85 | 3.55 | ----- |

FR = Factor de resistencia

Figura 1. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones NselF1 y NselF5 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki)



4.2 Resistencia de la población seleccionada en el laboratorio

Las selecciones se realizaron sobre una población promedio de individuos de 3010 por generación, a los cuales se les aplicaron dosis crecientes de 50, 60, 70 y 75 ppm en las generaciones sucesivas. En promedio sobrevivió un 33% de individuos en las generaciones seleccionadas (F1 –F4), lo que promedió una presión de selección de 69.64% (cuadro 2).

Cuadro 2. Presión de selección con el complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) en laboratorio ejercida durante 3 generaciones (Población Sel). 2002.

| Generación | Dosis ppm | No. Individuos seleccionados | No. Sobrevivientes | Presión de selección % |
|--------------|-----------|------------------------------|--------------------|------------------------|
| Huanimaro F1 | 50 | 2,940 | 1,050 | 64.28 |
| Sel F2 | 60 | 2,042 | 800 | 60.83 |
| Sel F3 | 70 | 3,458 | 850 | 75.41 |
| Sel F4 | 75 | 3,600 | 790 | 78.05 |
| Promedio | 63.75 | 3010 | 872.5 | 69.64 |

Las poblaciones Self1 y Self5, tuvieron valores de CL_{50} de 46 y 84 ppm, respectivamente, lo que significa un pequeño pero constante avance en la pérdida de susceptibilidad original con valores de FR de 1.31X y 2.45X en relación a la susceptibilidad de la población NSelf5, debido al ejercicio constante de una presión de selección promedio con el complejo espora-cristal de Bt (HD-1 *Kurstaki*) de 69.64% (Cuadro 3). Este resultado es diferente al

reportado por Díaz (1999), (Figura 2) en donde el factor de resistencia de 2.45X lo obtuvo en la selección de dos generaciones y Tabashnik (1992) en donde la obtiene de igual manera en dos generaciones.

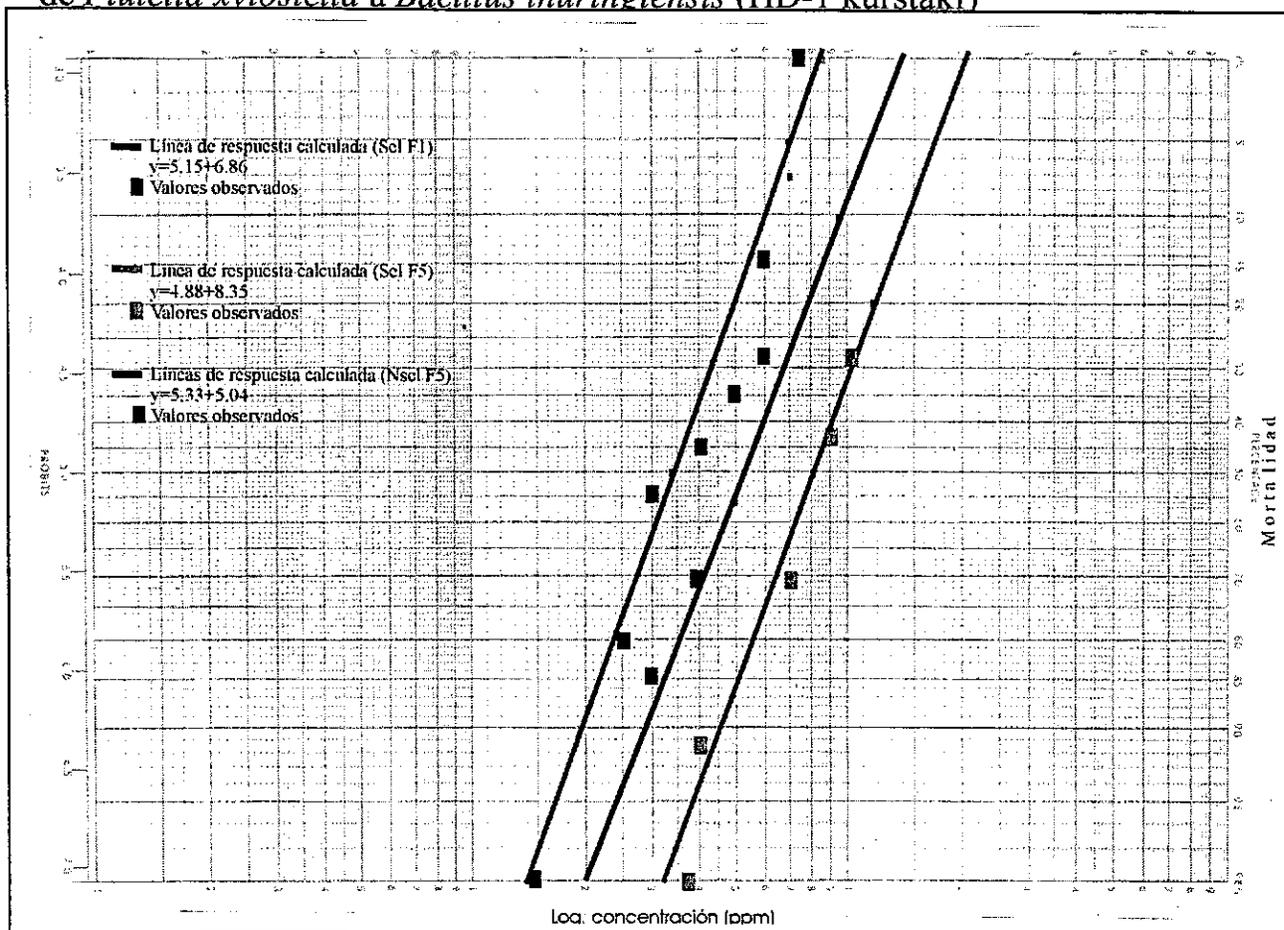
Cuadro 3. Concentraciones letales medias y factor de resistencia de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*). 2002.

| Población | CL ₅₀ (95% LF) | CL ₉₀ (95% LF) | Pendiente +/- SE | X ² | *FR |
|-----------|---------------------------|---------------------------|---------------------|----------------|-------|
| Nsel F5 | 34.48 (29.66-38.61) | 61.86(53.41-79.69) | 5.04+/-0.85 | 3.55 | ----- |
| Sel F1 | 45.25 (41.74-48.74) | 69.58(62.90-80.79) | 6.86+/-0.85 | 4.19 | 1.24 |
| Sel F5 | 84.77 (75.53-97.78) | 120.69(102.67-196.32) | 8.35+/-2.31 | 0.41 | 2.45 |

*FR = Factor de resistencia



Figura 2. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF1, SelF5 y NselF5 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki)



4.3 Estudio Genético

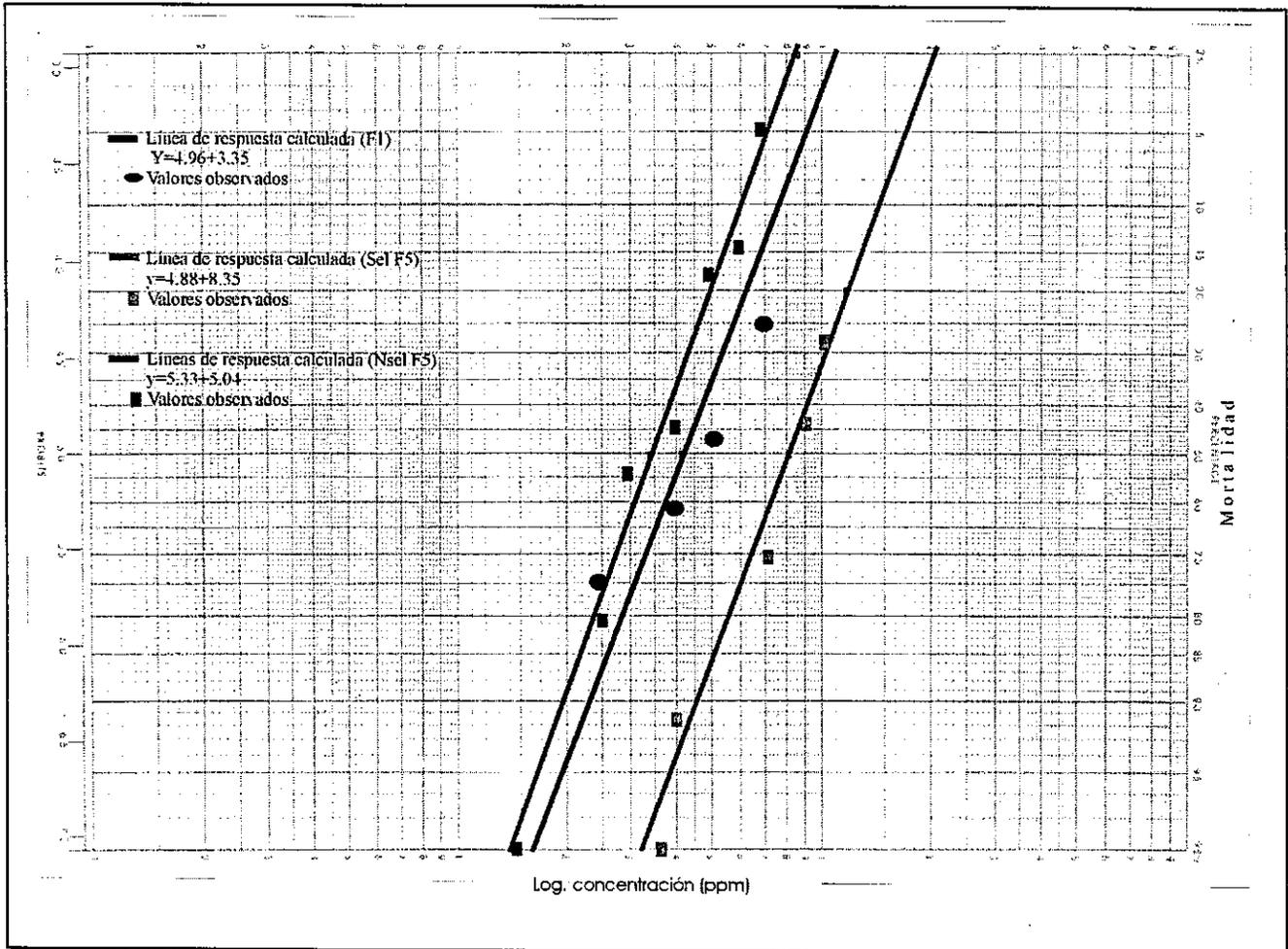
Al efectuarse la cruce de las hembras seleccionadas (SelF5) con los machos de la población no seleccionada (NselF5) y obtener la progenie F1, el valor de CL₅₀ se redujo a 43.49 ppm, lo cual representó un regreso casi completo a la susceptibilidad original del macho padre (34.28), lo que permitió suponer de la probable presencia de gene(s) parcialmente recesivo(s) (Cuadro 4 y Figura 3).

Cuadro 4. Cruzas y retrocruzas de las poblaciones de *Plutella xylostella* seleccionadas y no seleccionadas con *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*) 2002

| Población | CL ₅₀ ppm (95% LC) | CL ₉₀ ppm (95% LC) | Pendiente +/- SE | X ² | FR* |
|---|----------------------------------|----------------------------------|---------------------|----------------|------|
| Nsel F5 | 34.48 (29.66-38.61) | 61.86(53.41-79.69) | 5.04 +/- 0.85 | 3.55 | ---- |
| Sel F5 | 84.77 (75.53-97.78) | 120.69(102.67-196.32) | 8.35 +/- 2.31 | 0.41 | 2.4 |
| Hembra Sel F ₅ X | 43.49 (35.30-54.82) | 104.89(73.19-365.29) | 3.35 +/- 0.98 | 1.48 | 1.2 |
| Macho Nsel F ₅ = F ₁ Hembra Sel F ₅ X Macho F ₁ | 77.07 (68.81-86.79) | 132.09(111.66-178.17) | 5.47 +/- 0.90 | 2.54 | 2.2 |

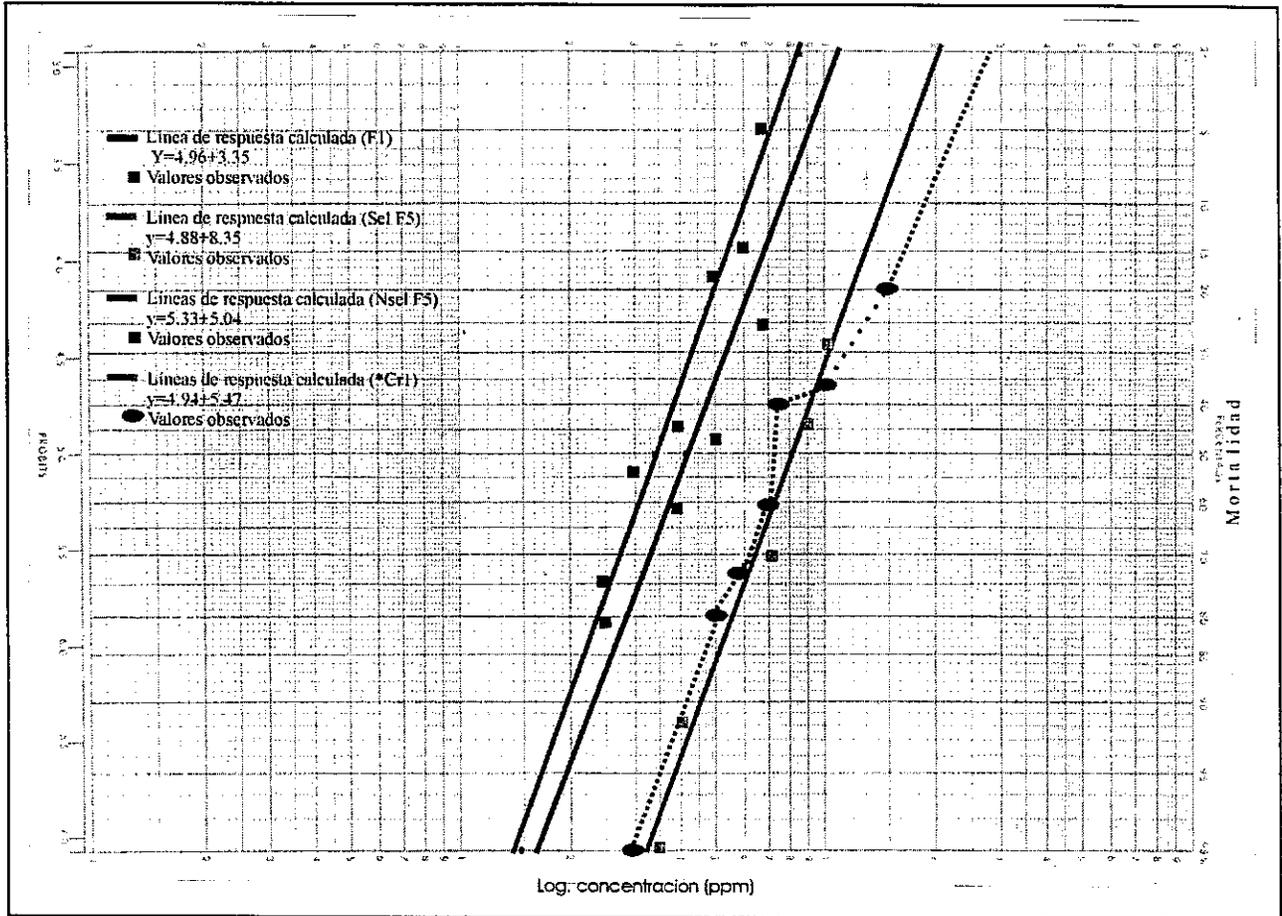
* Factor de resistencia

Figura 3. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF5, NselF5 y F1 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki)



Para comprobar el anterior supuesto se realizó la retrocruza de los machos de la F1 con las hembras Self5. La mortalidad obtenida en el bioensayo muestra una tendencia tal que permite distinguir dos líneas distintas separadas por un plano (Figura 4). Lo anterior sugiere una frecuencia genotípica de 60% de heterocigotes y 40% de homocigotes resistentes, lo que permite suponer que la resistencia desarrollada al complejo espora-cristal de *Bacillus thuringiensis* (HD-1 *kurstaki*), obtenida por la selección en el laboratorio durante 3 generaciones, llegó hasta la obtención de una población con resistencia homocigótica casi pura, controlada por la presencia de más de un gene (Abedi y Brown, 1960). El resultado de la población de Huanimaro del estado de Guanajuato, es coincidente con los obtenidos en otras poblaciones de *Plutella xylostella* de las localidades de Salamanca y Los Rodríguez estudiadas por Díaz (1999) en el mismo estado, pero diferente a los obtenidos por Tabashik (1992) que afirma que la resistencia es completamente recesiva. Comparado con este trabajo de investigación se confirma que la resistencia es parcialmente recesiva.

Figura 4. Líneas de susceptibilidad de las poblaciones SelF5, NselF5, F1 y *CR1 de *Plutella xylostella* a *Bacillus thuringiensis* (HD-1 kurstaki)



*Cruza Reciproca

V. CONCLUSIONES

Las conclusiones de este trabajo se resumen en cuatro puntos:

- 1) la población colectada de Huanimaro Gto., que ha sido históricamente seleccionada en el campo con aplicaciones de productos comerciales de Bt recobró levemente susceptibilidad al reproducirse por cinco generaciones sin selección en el laboratorio, lo que indica una baja evolución de la resistencia de *Plutella xylostella* a Bt en el campo.
- 2) la selección de la población de *P. xylostella* durante tres generaciones a una presión aproximada de 70% de mortalidad causó una resistencia baja pero suficiente para realizar el estudio genético.
- 3) la cruce de la población seleccionada (Self5) con la población no seleccionada (Nself5) dio origen a una población con susceptibilidad muy cercana a su madre no seleccionada lo que indica que la resistencia es un carácter parcialmente recesivo.
- 4) la retrocruza con la madre resistente dio origen a una población que muestra una frecuencia de genotipos susceptibles del 60% lo que indica que más de un gene están determinando la resistencia.

VI. BIBLIOGRAFÍA

- Abedi, Z. H. y A. W. A. Brown. 1960. Development and reversion of DDT-resistance in *Aedes aegypti*. Can. J. Genet. Cytol. 2: 252-261.
- Andrews, R.E.jr., R.M. Faust, H. Wabiko, K.C. Raymond and L.A. Bulla, Jr. 1987. The Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology, 6: 163-232.
- Busvine, J. R. 1971. A Critical Review of the Techniques for Testing Insecticides. 2nd. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. England. 345 pp.
- Carrillo, S. 1966. Lista de Insectos en la Colección Entomológica del INIA. Primer suplemento. INIA. SAG. México. Folleto no. 14. 133 p.
- Crickmore, N., D.R. Zeigler, J. Feitelson, E. Schnepf, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum and D. H. Dean. 1998. Revision of the Nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* Pesticidal Crystal Proteins. Microbiol. Mol. Biol. R. 62:807-813.
- De Barjac, H. and A. Bonnefoi. 1962. Essai de classification biochimique et serologique de 24 souches de *Bacillus* du type *thuringiensis*. Entomophaga 7: 5-31.
- Díaz, G. Ovidio. 1999. Manejo de resistencia a las delta endotoxinas de *Bacillus thuringiensis* berliner en *Plutella xylostella* (L.). Tesis Doctoral, Colegio de postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México.
- Entwistle, F., J. S. Cory, M. J. Bailey and S. Higg. 1993. *Bacillus thuringiensis*, An Enviromental Biopesticide: Theory and Practice. John Wiley and Sons, Ltd. London.

- Federici, B.A., P. Luthy and J.E. Ibarra. 1990. Parasporal body of *Bacillus thuringiensis israelensis*, structure, protein composition, and toxicity. Chpt. 3. In: Bacterial Control of Mosquitoes and Blackflies. H. De Barjac and D.J. Sutherland (eds.) Rutgers University Press. New Brunswick pp. 16-44.
- Federici, B.A. 1993. Insecticidal bacterial proteins identify the midgut epithelium as a source of novel target sites for insect control. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, 22: 357-371.
- Ferre, J., M.D. Real, J. Van Rie, S. Jansens and M. Peferoen. 1991. Resistance to the *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide in a field population of *Plutella xylostella* is due to a change in a midgut membrane receptor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5119-5123.
- Finney, D.J. 1952. Probit analysis. 2nd. ed. Cambridge Univ. Press. 318 pp.
- Georghiou, G. P. 1972. The evolution of resistance to pesticides. Ann. Rev. Ecol. and Syst. 3:133-168.
- Georghiou, G. P. 1990. Resistance Potencial to Biopesticides and Consideration of Countermeasures. Elsevier Science Publishers (Biomedical Division) Pesticides and Alternatives. J. E. Casida (Ed). p. 409-419.
- Gill, S.S., E.A. Cowles, y P.V. Pietrantonio. 1992. The mode of action of *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Annu. Rev. Entomol. 37: 615-636.
- Glare, T.R. and M. O'Callaghan. 2000. *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. John Wilery & Sons, LTD. New York. 350pp.
- Höfte H., and Whiteley, H.R. 1989. Insecticidal Crystal Proteins of *Bacillus thuringiensis*. Microbiol. Rev. 53(2): 242-255.
- Ibarra J.E., 2000. XI Curso Nacional de Control Biológico. Memorias y Manual. Pags. 93-108.

- Ibarra J. 1993. Desarrollo de resistencia hacia *Bacillus thuringiensis*. In: Soc. Mex. Entomol. (Ed.). XXVII Congreso Nacional de Entomología. Cholula, Puebla. México. p 231-232.
- INEGI, Cultivos Anuales de México. VII Censo Agropecuario . 1991. Pag. 70
- Krieg, A., A. Huger, G. Langenbruch and W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *Tenebrionis*: Ein neuer gegenuber larven von coleopteren wirksamer pathotyp. Z. Angew. Entomol. 96: 500-508.
- Laborde, C. J. A. 1992. Palomilla dorso de diamante en el Bajío, control mediante un programa integral regional. In: Anaya R. S. (Eds.). Manejo Fitosanitario de las hortalizas en México. CP-SARH. Chapingo, México. p 245-248.
- López, A.M. 1990 Susceptibilidad a Insecticidas en la "Palomilla Dorso de Diamante" *Plutella Xylostella*, l. (Lep: Yponomeutidae) Procedente de Chapingo y dos localidades en la Región Horticola de El Bajío, México. Tesis de Grado en Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados, Montecillos, México. 1990.
- McGaughey, W.H. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. Science 229: 193-195.
- Metcalf, C.L. 1966. Insectos Destructivos e Insectos Utiles. Sus costumbres y su control. 4ª edición. Ed. C.E.C.S.A. México 1966.
- Metcalf, R.L., William H.L. 1990. Introducción al Manejo de Plagas de Insectos. Ed. Limusa-Noriega. México 1990. Pag. 279.
- Pérez, C.J. and Shelton A.M. 1997. Resistance of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* Berliner in Central America. Entomol. 87-93pp.
- Powell, G.P., C.A. Charlton and T. Yamamoto. 1995. Recent Advances in structure and Fuction Research on *Bacillus thuringiensis* Biotechnology and Enviromental Benefits. Vol. 1. Hua Shiang Yuan Publishing Co. Taipei. Pp 1-20.

- Rowe, G.E. and Margaritis, A. 1987. Bioprocess development in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. CRC Critical Reviews in Biotechnology 6: 87-127.
- Shelton, A. M., J. L. Robertson, J. D. Tang, C. Pérez, S. D. Eigenbrode, H. K., Preisler, W. T. Wilsey and R. J. Cooley. 1993a. Resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) to *Bacillus thuringiensis* subspecies in the field. J. Econ. Entomol. 86:697-705.
- Shelton, A. M., J. A. Wyman, N. L. Cushing, K. Apfelbeck, T. J. Dennehy, S. E. R. Mahr and S. D. Eigenbrode. 1993b. Insecticide resistance of diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae) in North America. J. Econ. Entomol. 86: 11-19.
- Stone, T. B., S. R. Sims, S. C. MacIntosh, R. I., Fuch and P. G. Marrone. 1991. Insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. In: Maramorosch K. (Ed.), Biotechnology for Biological Control of pests and Vectors. Boca Raton Ann Arbor Boston London. p. 54-66.
- Tabashnik, B. E. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). Annu. Rev. Entomol. 39: 47-79.
- Tabashnik, B. E. *et al.* 1992. Inheritance of resistance to *Bacillus thuringiensis* in diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 85: 1053-1055
- Tabashnik, B. E., N. Finson and M. W. Johnson. 1991. Managing resistance to *Bacillus thuringiensis*: lessons from the diamondback moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 84: 49-55.
- Tabashnik, B.E. *et al.* 1990 Field development of resistance to *Bacillus thuringiensis* in Diamondback Moth (Lepidoptera: Plutellidae). J. Econ. Entomol. 83: 1671-1676.
- Talekar, N. S. 1986. Diamondback moth management: proceeding of the first international work-shop. Asian Vegetable Research and Development Center, Shanhua, Taiwan. p. 241-438.

- Tang, J. D., A. M. Shelton, R. T. Roush and W. J. Moar. 1995. Consequences of shared toxins in strains of *Bacillus thuringiensis* for resistance in diamondback moth. *Resistant Pest Management* 7:5-7.
- Van Rie, J., W. H. McGaughey, D. E. Jonson, B. D. Barnet and H. Van Mellaert. 1990. Mechanism of insect resistance to the microbial insecticide *Bacillus thuringiensis*. *Science* 247:72-74.
- Vázquez, G. Marcelino. 1983. Investigations of the potentiality of resistance to *Bacillus thuringiensis* Ser. H-14 in *Culex quinquefasciatus* through accelerated selection pressure in the laboratory. Tesis doctoral, University of California, Riverside, L.A.