

# ELABORACIÓN DE UN BIOINSECTICIDA CONTRA EL GUSANO BARRENADOR DE LA CAÑA DE AZÚCAR

NINFA M. ROSAS GARCÍA\*, KATIUSHKA AREVALO NIÑO\*, BENITO PEREYRA ALFÉREZ\*, HIRAM MEDRANO ROLDÁN\*\*  
LUIS J. GALÁN WONG\*, JUAN FRANCISCO PÉREZ DOMÍNGUEZ\*\*\*, LILIA H. MORALES RAMOS\*



El control biológico se ha utilizado desde hace varias décadas para combatir plagas de importancia económica. El uso de este recurso ha ido en aumento, anteponiéndose como una alternativa a los insecticidas químicos que tanto dañan el ambiente. El microorganismo que se ha utilizado con mayor preferencia en este tipo de insecticidas es *Bacillus thuringiensis*, una bacteria esporulada que produce un cristal proteico ( $\delta$ -endotoxina), al cual se le atribuye la actividad insecticida. Dicho cristal, al ser ingerido por el insecto, se convierte en una toxina activa en el intestino, formando en él canales iónicos que permiten el libre flujo de iones y líquidos, lo cual causa la muerte del insecto. El uso de productos formulados de *Bacillus thuringiensis*, a nivel mundial, se ha incrementado notablemente, y la mayor aplicación de éstos es para el control forestal y agrícola de lepidópteros.<sup>1</sup> Dentro de los lepidópteros están las especies del género *Diatraea*, principalmente *D. saccharalis*, que provocan grandes pérdidas en los cultivos de caña de

azúcar y maíz. El daño se debe a que las larvas cavan galerías dentro de los tallos, lo que reduce el crecimiento y debilita la planta, al punto en que algunas pueden quebrarse o morir. Básicamente el daño a la caña de azúcar causado por este insecto se caracteriza por el corazón muerto en las plantas jóvenes, punta muerta en las plantas más viejas, tallos rotos, pérdida de peso en azúcar y daño a la caña que se utiliza para semillas.<sup>2</sup> Los reportes encontrados hasta la fecha indican que las plagas de *Diatraea* sp. son combatidas con químicos o bien por control biológico con parasitoides,<sup>3</sup> sin embargo, este recurso presenta serias desventajas, como la incompatibilidad fisiológica entre otros muchos factores, que impiden que este tipo de control resulte exitoso en un momento determinado. Actualmente existe poca información acerca del control de *D. saccharalis* mediante *B. Thuringiensis*,<sup>4</sup> esto da lugar al diseño y utilización de un bioinsecticida a base de una cepa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica específica para *D. saccharalis*, considerándolo como una alternativa viable y factible para el control de esta plaga. Desde un punto de vista general, el desarrollo de este bioinsecticida presenta múltiples ven-

□ El presente artículo está basado en la investigación «Elaboración de formulados de *Bacillus thuringiensis* var. kurstaki y determinación de la actividad tóxica contra larvas de *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Lepidoptera: pyralidae) en laboratorio y campo», galardonado con el Premio de Investigación UANL 2002 en la categoría de Ciencias de la Tierra y Agropecuarias, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario de la UANL, en septiembre de 2003.

\*Departamento de Microbiología e Inmunología, Facultad de Ciencias Biológicas, UANL., San Nicolás de los Garza, N.L.

\*\*Departamento de Biotecnología Industrial, Instituto Tecnológico de Durango, Durango, Dgo., México.

\*\*\*Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Campo Experimental Centro de Jalisco, Ocotlán Jal.

tajas sobre los tipos de control ya utilizados, debido a que *B. thuringiensis* es altamente específico, y no presenta las desventajas que implica el uso de parasitoides, por lo que la importancia de este trabajo reside en la selección y formulación de una cepa de *B. thuringiensis* con actividad tóxica contra este insecto, proporcionando una alternativa inocua al medio ambiente y eficaz.

## Metodología

### *D. saccharalis*

La cría se inició a partir de 30 pupas proporcionadas por el Departamento de Agricultura de Estados Unidos en Weslaco TX. Se mantuvieron durante todo el ciclo biológico en dieta artificial,<sup>5</sup> modificada. La producción de larvas se mantuvo o se aumentó según los requerimientos.

### *B. thuringiensis*

Se utilizaron 12 cepas de *B. thuringiensis* HD y nativas de la colección del Departamento de Microbiología e Inmunología de la F.C.B., las cuales fueron: HD-1 var. *kurstaki*, HD-2 var. *thuringiensis*, HD-9 var. *entomocidus*, HD-29 var. *galleriae*, HD-37 var. *dendrolimus*, HD-59 var. *thuringiensis*, HD-133 var. *aizawai*, HD-137 var. *aizawai*, HD-551 var. *kenya*, GM7 var. *aizawai*, GM10 var. *aizawai* y GM34 var. *kurstaki*.

A nivel de matraz se obtuvieron los extractos del complejo espora-cristal por el método de lactosa-acetona.<sup>6</sup>

Cada uno de los extractos obtenidos se utilizó en bioensayos de toxicidad contra larvas de dos días de edad de *D. saccharalis*. Las dosis utilizadas fueron de 50 y 500 µg del extracto de *B. thuringiensis* por ml de dieta.

Se seleccionaron las cepas que presentaron una actividad tóxica arriba del 50% con la dosis de 50 µg/ml y se sometieron a un nuevo bioensayo, utilizando ocho concentraciones para determinar la concentración letal media. Las concentraciones utilizadas fueron: 10, 15, 20, 25, 35, 55, 65, y 100 µg/ml, y los resultados obtenidos se sometieron al método estadístico Probit. La mortalidad se registró siete días consecutivos, para determinar el tiempo letal medio.

En las cepas tóxicas se identificaron los genes *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1B* y *cry1C*, mediante la

reacción en cadena de la polimerasa (PCR).<sup>7</sup> Se realizaron ensayos de inmunodetección para determinar el tipo de toxina producida. Los antisueros utilizados fueron el antiCry1Ac, que reconoce Cry1Aa, Cry1Ab y Cry1Ac y el antiCry1B.<sup>8</sup>

En base a estos procedimientos, se seleccionó la cepa más efectiva y se propagó a nivel de fermentador para obtener grandes cantidades del complejo espora-cristal; la recuperación del complejo se realizó por el método de lactosa-acetona.<sup>6</sup>

### Bioensayos de preferencia alimenticia

Los bioensayos de preferencia alimenticia se realizaron para determinar el polímero y el fagoestimulante más aceptado por *D. saccharalis*. Para esta prueba se elaboraron formulados granulares sin extracto de *B. thuringiensis* de la siguiente manera: los polímeros utilizados fueron: (almidón de maíz modificado) gelatina bovina y pectina de limón. Los fagoestimulantes utilizados fueron Coax® (fagoestimulante comercial), azúcar (sacarosa) y caña de azúcar en polvo. Los formulados se elaboraron mezclando 50 g del polímero con y sin fagoestimulante al 4% + 25ml de agua destilada (por cada 50g de polímero), todas las mezclas se incorporaron con una espátula hasta obtener un sólido con forma de miga. Posteriormente las mezclas se pasaron a través de una criba con malla número 6, para eliminar las partículas más grandes y hacer uniforme su tamaño, se colocaron en moldes de aluminio recubiertos con papel encerado y se desecaron en un horno de tiro forzado a una temperatura de 40 a 45°C por 24 h. Una vez desecadas, las mezclas se molieron con un mortero o se desmoronaron manualmente. Las formulaciones granulares obtenidas se almacenaron en botes de plástico herméticos a temperatura ambiente para su uso posterior. Se obtuvieron 12 tipos de formulaciones granulares, con las cuales se realizó el bioensayo de preferencia alimenticia por el método de dos alternativas.<sup>9</sup> Se enfrentaron todos los pares posibles, y resultaron 78 combinaciones. Se utilizaron 10 larvas neonatas para cada par probado, con cinco repeticiones para cada uno.

Según los resultados obtenidos en los bioensayos de preferencia alimenticia, se desarrollaron formulados granulares y asperjables con el polímero y el fagoestimulante más aceptado por *D. Saccharalis*, usando *B. thuringiensis* al 3, 7, 10% para pruebas de laboratorio. Para la elaboración de los formulados granulares, se siguió la misma metodología que

se utilizó para la elaboración de los formulados granulares en los bioensayos de preferencia alimenticia, considerando en este caso la adición de *B. thuringiensis* a las concentraciones mencionadas. Para la elaboración de los formulados asperjables se hicieron las soluciones acuosas con los polímeros correspondientes, en las cuales se dispersó el fagoestimulante y el extracto de *B. Thuringiensis*.<sup>10</sup>

#### Bioensayos para determinar actividad tóxica

Para los formulados granulares se utilizaron cajas de petri desechables de 5 cm de diámetro, con el fondo cubierto con una capa de pasta de parís y carbón activado, se colocaron en el centro 0.2 g del formulado, dejando humedecer por espacio de una hora, posteriormente se colocaron 20 larvas de dos días de edad y se les permitió alimentarse sobre el formulado por 24 horas. Para cada formulado se hicieron cinco repeticiones, después de las 24 horas de exposición a los formulados, se determinó el porcentaje de mortalidad y se seleccionaron cinco larvas sobrevivientes de cada caja (25 en total para cada formulado), las cuales se transfirieron a copas individuales con dieta artificial, se determinó la mortalidad a los siete días.<sup>11</sup> Los formulados asperjables fueron reconstituidos en agua estéril para incorporarse a la dieta artificial de *D. saccharalis* ajustando las tres concentraciones de los formulados a la dosis 50 µg/ml. El bioensayo fue realizado con la metodología antes descrita para los bioensayos de toxicidad de los extractos de *B. thuringiensis*.

#### Pruebas de campo

Se utilizó una parcela con el cultivo de caña de azúcar *Saccharum officinarum*, ubicada en la localidad de La Escalera, municipio de Ameca, Jalisco, y se realizó durante los meses de mayo a agosto de 2001. La variedad presente en el área del experimento fue la MEX-801410. Los tratamientos utilizados fueron: testigo sin aplicación, blanco granular, blanco asperjable, granular 3%, granular 7%, granular 10%, asperjable 3%, asperjable 7%, asperjable 10% y un testigo comercial (Lepinox). La unidad experimental estuvo constituida por 10 surcos de 12 m con 1.2 m de distancia entre surcos. El área total de tratamiento fue de 672 m<sup>2</sup> y el experimento tuvo un área total de 6,270 m<sup>2</sup>. Las aplicaciones de las dosis insecticidas fueron realizadas cuando la población de barrenadores se encontró

en estado de "larva penetrante", esto es, en primer y segundo instar, antes de penetrar los tallos. La cantidad de aplicaciones fue dependiente del número de generaciones evaluadas en el experimento. Los formulados asperjables se aplicaron al follaje con una aspersora de líquidos, y los formulados granulares se aplicaron con saleros, según la dosis correspondiente a cada unidad experimental. Para evaluar los daños en cada unidad experimental se realizaron muestreos dos horas antes de la aplicación de los tratamientos y a los 5, 38 y 64 días de la aplicación, y se evaluó el número de cepas con tallos dañados. A las cañas muestreadas se les realizó un corte longitudinal para apreciar con precisión los canutos dañados tanto por la mordedura directa de la larva, así como por la coloración roja que produce la toxina del muermo rojo *Physalospira tucumanensis*, siempre que ésta sea producida por el daño del barrenador.

## Resultados

El establecimiento de la cría de *D. saccharalis* dio como resultado una cría masiva, suficiente para la realización de bioensayos a nivel de laboratorio y de campo. El tiempo de generación se logró acortar a 30-35 días. Las cepas que se consideraron tóxicas a *Diatraea saccharalis* fueron: HD-133, HD-551, GM7, GM10 y GM34. El análisis de varianza y la comparación de medias por la prueba de Tukey,  $Pd \leq 0.05$  indicaron que no hay diferencia significativa en la mortalidad causada por estas cinco cepas ( $F = 1.852$ ,  $gl = 4$ ,  $Pd \leq 0.05$ ). Sin embargo, la cepa que presentó la menor  $CL_{50}$  (33.21 µg/ml) fue la GM34. La cual es tres veces más tóxica que la GM10, casi tres veces más que la GM7, 2.6 veces más tóxica que la HD-133 y dos veces más tóxica que la HD-551. El tiempo letal medio para la cepa GM34 fue de tres días.

Los análisis de PCR revelaron la presencia de los genes *cry1* en cada una de la cepas: HD-133 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1C*; HD-551 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*; GM7 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1B*; GM10 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*, *cry1C*; GM34 *cry1Aa*, *cry1Ab*, *cry1Ac*. El análisis de inmunodetección mostró que las cinco cepas tóxicas sintetizan alguna de las proteínas Cry1A, y únicamente la cepa HD-551 sintetiza la proteína Cry1B, de acuerdo al análisis de PCR la cepa GM7 posee el gen *cry1B*; sin embargo, en la inmunodetección no se observó la producción de la proteína correspondiente a este gen.

De todas las formulaciones, incluyendo el control que consistió en trozos frescos de caña de azúcar, el análisis de varianza reveló que existe una alta diferencia significativa entre todos los formulados y el control ( $F = 96.2912$ ,  $gl = 12$ ,  $P < 0.01$ ). Además reveló diferencias significativas entre los fagoestimulantes ( $F = 24.6526$ ,  $gl = 1$ ,  $Pd \leq 0.01$ ) e indicó el orden de preferencia: caña de azúcar fresca > caña de azúcar en polvo > azúcar > Coax®. Por la prueba de Tukey, se determinó que los formulados más aceptados por las larvas fueron los elaborados a base de almidón-gelatina-caña de azúcar en polvo y almidón-pectina-caña de azúcar en polvo, siendo seleccionado el primero por ser los polímeros y fagoestimulantes más económicos y de alta disponibilidad.

En función de los resultados obtenidos, se seleccionó el soporte Capsul®-gelatina-caña de azúcar en polvo y la cepa GM34 para elaborar el formulado en forma granular y asperjable. Posteriormente se procedió a la realización de los bioensayos, en donde los formulados granulares causaron una mortalidad de 44% para la concentración de 3%; 76% para la concentración de 7% y 81% con la concentración de 10%. Los asperjables causaron una mortalidad similar entre las tres dosis, ya que ésta había sido ajustada, 97.22% para la concentración de 3%; 84% para la concentración de 7% y 88% para la concentración de 10%.

Las especies de barrenadores presentes en las pruebas de campo fueron *Diatraea considerata* y *Eoreuma loftini*, las larvas encontradas en el muestreo a los cinco días de la aplicación fueron de 3° a 5° ínstar. De acuerdo al análisis de varianza, se aprecia que la mayor cantidad de cepas con incidencia de daño ocurrió en la etapa inicial del experimento, esto es, el día de la aplicación, al quinto día después de la aplicación se observó una incidencia de daño menor en las cepas tratadas, y en los muestreos a los 38 y 64 días después de la aplicación, la incidencia de tallos dañados fue muy baja. Al aplicar la técnica de contrastes ortogonales, el análisis de varianza indicó que hubo diferencias en el contraste de la dosis baja del asperjable (3%), contra las dosis media y alta del asperjable (7 y 10%), teniendo menor efectividad la del 3%. Los contrastes ortogonales indicaron además diferencias altamente significativas entre los tratamientos granulares y asperjables, entre los tratamientos granulares y el testigo comercial y el día de la aplicación y a los cinco días después de la aplicación. A los 38 y 64

días después de la aplicación no hubo diferencias significativas en ningún contraste debido a que la incidencia poblacional de barrenadores no se incrementó. Los tratamientos con formulados granulares tuvieron los niveles de daño más altos, superando incluso al testigo sin aplicación.

## Discusión

*Diatraea saccharalis* es una plaga cuyas infestaciones alcanzan índices hasta de 30% de canutos barrenados. Bajo estas condiciones se estima que las pérdidas producidas pueden ser cuantiosas, considerando que arriba del 15% se cataloga como grado de infestación alto. Su combate ha representado uno de los principales problemas, debido a que casi la totalidad del período larval lo pasa en el interior de los tallos de la caña, protegiéndose de esta manera de las condiciones climáticas y de los insecticidas.<sup>12</sup> A través de los últimos 40 años se han realizado importantes esfuerzos para encontrar alternativas viables para el control de esta plaga, sin embargo los resultados han sido muy pobres. El hallazgo de la cepa GM34 proporciona una alternativa viable para el control de este insecto.

Existe una gran relación entre la toxicidad de la cepa GM34 con la presencia de los genes *cry1A* y las proteínas que sintetiza, sin embargo no se descarta que la toxicidad de la cepa pueda provenir de algún otro gen diferente a los que se detectaron.

Este estudio demostró que la presencia de los fagoestimulantes aumentó la preferencia de un formulado en particular por parte de las larvas y que los polímeros biodegradables afectaron positiva o negativamente la preferencia. Las larvas de esta plaga prefirieron ampliamente la formulación elaborada con almidón, gelatina y caña de azúcar en polvo, sobre todas las otras combinaciones realizadas. Se observa entonces, que para un control exitoso de esta plaga, la formulación no sólo depende de la cepa seleccionada de *B. thuringiensis* sino también de los ingredientes inertes que sirven como acarreadores del principio activo, por lo que es necesario hacer un estudio de la amplia variedad de aditivos existentes para mejorar las formulaciones y esto dependerá en gran medida del insecto y de sus hábitos alimenticios.

Los formulados dieron resultados exitosos en laboratorio, lo que alentó la continuación de los estudios de estos formulados a nivel de campo.

Una de las condiciones primordiales para el éxi-

to de este bioinsecticida es que las aplicaciones deben realizarse en el tiempo adecuado, es decir, cuando las larvas pequeñas son el estado predominante y aún no han penetrado al tallo.

Respecto a los formulados asperjables resultaron más exitosos, porque recubren el follaje de la planta, quedando ésta bien protegida. Los tratamientos granulares tuvieron los niveles de daño más altos, superando incluso al testigo sin aplicación, lo que puede atribuirse a la falta de adherencia del gránulo a la hoja de la planta, por lo que debe ser considerado el uso de adherentes para mejorar estas formulaciones, otra causa posible es que las parcelas no hayan presentado una infestación homogénea, además de la falta de tecnología disponible para aplicar formulados granulares. El formulado asperjable, cuya concentración es del 10%, mostró características adecuadas para ser utilizado en campo y competir con los insecticidas comerciales cuyas concentraciones fluctúan entre 15 y 20%. La persistencia en campo para el formulado asperjable fue de cinco días, comparado con dos o tres días de persistencia en otras formulaciones. Estas características dan ventajas al formulado asperjable, introduciendo una nueva alternativa en el control de esta plaga.

## Resumen

La elaboración de una formulación a base de *Bacillus thuringiensis*, que incluya polímeros biodegradables y fagoestimulantes, se plantea como una alternativa para el control del barrenador de la caña de azúcar *Diatraea saccharalis*. La formulación óptima fue: almidón-gelatina-caña de azúcar en polvo a la cual se le adicionó la cepa GM34 seleccionada por su alta toxicidad. Los formulados fueron evaluados a nivel de laboratorio, donde dieron óptimos resultados, y a nivel de campo, donde el mejor formulado resultó ser el asperjable con una concentración menor que los formulados comerciales, dando esto una ventaja para su posible comercialización.

**Palabras clave:** *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, Control biológico, Formulación, Caña de azúcar.

## Abstract

The production of a *Bacillus thuringiensis*-based formulation including biodegradable polymers and

feeding stimulants, is proposed as an alternative to control the sugarcane borer *Diatraea saccharalis*. The best combination of ingredients to prepare the formulation was: encapsuled-gelatin-powdered sugarcane and the GM34 strain, which was selected due to its high toxicity. The formulations were evaluated in laboratory successfully. Field tests were conducted and the best result was the sprayable formulation which contains a lower concentration of *B. thuringiensis* than commercial formulations. This feature gives an advantage for its possible commercialization.

**Keywords:** *Bacillus thuringiensis*, *Diatraea saccharalis*, Biological control, Formulation, Sugarcane.

## Referencias

1. Rhodes, D. 1993. Formulation of biological control agents. *En* Exploitation of Microorganisms. D. G. Jones [ed] Chapman and Hall. London.
2. Davison, R. H. 1992. Plagas de pastos y cereales. pp.189-207. *En* Plagas de insectos agrícolas y del jardín. Noriega [ed.]. Limusa. México.
3. Wiedenmann, R. N. y J. W. Smith, Jr. 1993. Functional response of the parasite *Cotesia flavipes* (Hymenoptera: Braconidae) at low densities of the host *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Environ. Entomol.* 22: 849-858.
4. Bohorova, N., M. Cabrera, C. Abarca, R. Quintero, A. M. Maciel, R. M. Brito, D. Hoisington y A. Bravo. 1997. Susceptibility of four tropical lepidoperan maize pests to *Bacillus thuringiensis* CryI-type insecticidal toxins. *J. Econ. Entomol.* 90: 412-415.
5. Shorey, H. H. 1963. A simple artificial rearing medium for the cabbage looper. *J. Econ. Entomol.* 56: 536-537.
6. Dulmage, H. T., J. A. Correa y A. J. Martinez. 1970. Coprecipitation with lactose as a means of recovering the spore-crystal complex of *Bacillus thuringiensis*. *J. Invertebr. Pathol.* 15: 15-20.
7. Cerón J., L. Covarrubias, R. Quintero, A. Ortiz, M. Ortiz, E. Aranda, L. Lina y A. Bravo. 1994. PCR analysis of the *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. *Appl. Environ. Entomol.* 60: 353-356.
8. Iracheta-Cárdenas, M. M. 1999. Toxicidad de la clase Cry1 de *Bacillus thuringiensis* y su unión

- a receptores en *Trichoplusia ni*. Tesis de Doctorado en Ciencias. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L., México.
9. Bartelt, R. J., M. R. McGuire y D. A. Black. 1990. Feeding stimulants for the European corn borer (Lepidoptera:Pyralidae): Additives to a starch-based formulation for *Bacillus thuringiensis*. Environ. Entomol. 19: 182-189.
  10. Luna Santillana, E. J. 1998. Formulaciones asperjables de *Bacillus thuringiensis* a base de pectina y gelatina, y evaluación tóxica contra *T. ni*. Tesis de Licenciatura, O.B.P. Facultad de Ciencias Biológicas. UANL, Monterrey, N.L. México.
  11. Dunkle, R. L. y B. S. Shasha. 1988. Starch-encapsulated *Bacillus thuringiensis*: A potential new method for increasing environmental stability of entomopathogens. Environ. Entomol. 17: 120-126.
  12. Legaspi, J. C., R. R. Saldaña y N. Rozeff. 1984. Identifying and managing stalkborers on Texas sugarcane. Bulletin of the Entomological Society of America. 30: 3.