

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

**BUSQUEDA, AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NATIVAS EN GUATEMALA, PARA EL CONTROL DE LAS ESPECIES DE *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.**



PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE  
AGRONOMIA DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

POR  
**JULIO FRANCISCO PENADOS BETANCOURT**

En el acto de investidura como  
**INGENIERO AGRONOMO**

EN  
**SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA**

EN EL GRADO ACADEMICO DE  
LICENCIADO

Guatemala, agosto de 1991

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca Central

DL  
01  
T(1332)

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**RECTOR :**

Dr. Alfonso Fuentes Soria

**JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA**

<b>DECANO:</b>	Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
<b>VOCAL PRIMERO :</b>	Ing. Agr. Maynor Estrada Rosales
<b>VOCAL SEGUNDO :</b>	
<b>VOCAL TERCERO :</b>	Ing. Agr. Wotzbelí Méndez Estrada
<b>VOCAL CUARTO :</b>	P. Agr. Alfredo Itzep.
<b>VOCAL QUINTO :</b>	P. Agr. Marco Tulio Santos
<b>SECRETARIO :</b>	Ing. Agr. Marco R. Estrada Muy

Guatemala, Agosto de 1991

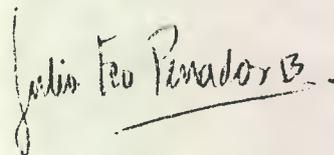
Señores:  
Honorable Junta Directiva  
Tribunal examinador  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos de Guatemala  
Presente

Señores:

En cumplimiento con las normas establecidas en la ley orgánica de la universidad de San Carlos de Guatemala, presento a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado " **Búsqueda, aislamiento y selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas en Guatemala, para el control de las especies de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua* "**.

Someto el presente trabajo ante ustedes, a efecto de cumplir con el requisito previo a optar al título profesional de Ingeniero Agrónomo, en el grado académico de Licenciado en Ciencias Agrícolas.

Atentamente.



**Julio Fco. Penados B.**

## ACTO QUE DEDICO

- A** Dios todopoderoso
- A** Jesús y María
- A mis padres** Julio Francisco Penados del Barrio  
Ana María Betancourt de Penados
- A mis hermanos** Anabella y su esposo Emilio R. Tager,  
Luis Fernando y su esposa Silvia Búrbero,  
y Silvia María.
- A mis sobrinos** Alenka maría, Emilio Francisco, José Ro-  
drigo, Pablo Andrés y Luis Fernando.
- A mis Abuelos,  
tios, primos,  
familiares y amigos** Con especial cariño

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todas aquellas personas, e instituciones que de una u otra forma hicieron posible el presente trabajo, especialmente:

- A: Ing. Agr. Franz Hentze Penados,  
Ing. Agr. Marco Tulio Aceituno Juaréz, por su valiosa asesoría e incondicional ayuda en la realización de la investigación.
- Al Ing. Agr. Salvador Sanchez cuyos aportes contribuyeron al enriquecimiento del presente estudio.
- Al Programa "MOSCAMED", particularmente al personal del laboratorio "La Aurora" por su colaboración en la formación y mantenimiento de las colonias de *Anastrepha sp.*
- Al Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria ( OIRSA ) por la asistencia técnica y económica proporcionada.
- Al Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI), en especial :  
Lic. Sheryl de Cabrera por su orientación, comprensión, apoyo y aportes acertados durante el desarrollo del presente trabajo.  
Lic. Fabiola de Micheo y amigos del laboratorio de microbiología por su colaboración y amistad.

A mis padres con mucho cariño,  
dedico este pequeño esfuerzo

## CONTENIDO

1.- RESUMEN	1
2.- INTRODUCCION	3
3.- DEFINICION DEL PROBLEMA	5
4.- MARCO TEORICO	7
4.1.- DESCRIPCION DE LAS ESPECIES PLAGA EN ESTUDIO	7
4.1.1.- <i>Anastrepha ludens</i>	8
4.1.2.- <i>Anastrepha obliqua</i>	9
4.2.- DESCRIPCION DE LA BACTERIA EN ESTUDIO	10
4.2.1.- HISTORIA	10
4.2.2.- TAXONOMIA Y CLASIFICACION	12
4.2.3.- TOXICIDAD	14
4.2.4.- MODO DE ACCION DE LA ENDOTOXINA	19
4.2.5.- APLICACIONES DEL <i>B.thuringiensis</i>	21
4.3.- POBLACION DE BACTERIAS EN EL SUELO	22
5.- OBJETIVOS	24
6.- HIPOTESIS	25
7.- METODOLOGIA	26
7.1 OBTENCION DEL MICROORGANISMO DEL SUELO	26
7.1.1 LOCALIZACION DEL AREA DE MUESTREO	26
7.1.2 TOMA DE MUESTRAS	28
7.1.3 CEPAS DE <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
7.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO	29
7.2.1 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO	29
7.2.2 FERMENTACIONES DEL <i>B. thuringiensis</i>	31
7.3 SEPARACIONES DE LAS FRACCIONES TOXICA	33

7.4	CONCENTRACION DE LAS SOLUCIONES TOXICAS .....	34
7.5	FORMACION Y MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS .....	34
7.5.1	FORMACION DE LAS COLONIAS DE <i>Anastrepha</i> sp.....	34
7.5.2	MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS DE <i>Anastrepha</i> sp. ....	35
7.6	BIOENSAYOS .....	36
7.6.1	PRUEBAS PRELIMINARES .....	36
7.6.2	PRUEBAS FINALES .....	37
7.7	DISEÑO EXPERIMENTAL .....	38
7.7.1	MODELO ESTADISTICO .....	39
7.7.2	DESCRIPCION DE LOS FACTORES Y MODALIDADES EVALUADAS .....	39
7.7.3	VARIABLE DE RESPUESTA .....	40
7.7.4	ANALISIS ESTADISTICO .....	40
8.-	RESULTADOS Y DISCUSION .....	42
9.-	CONCLUSIONES .....	58
10.-	RECOMENDACIONES .....	59
11.-	BIBLIOGRAFIA .....	61
12.-	APENDICES .....	65
	APENDICE 1 PRODUCCION DE SUSTANCIAS TOXICAS POR VARIETADES DE <i>B.thuringiensis</i> .....	66
	APENDICE 2 DETALLE DE CADA LUGAR DE MUESTREO.....	67
	APENDICE 3 PROCEDENCIA DE 26 CEPAS DE <i>B.thuringien-</i> <i>siensis</i> AISLADAS EN GUATEMALA EN 1,990.....	68
	APENDICE 4 IDENTIFICACION DE 12 CEPAS DE <i>B.thuringien-</i> <i>sis</i> PROPIEDAD DEL ICAITI .....	69

APENDICE 5 RESULTADO OBTENIDO EN LAS PRUEBAS  
DE SELECCION DE 52 CEPAS DE *B. thuringiensis* .....70

APENDICE 6 PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS DUNCAN PARA LA  
INTERACCION ENTRE 5 CEPAS Y SUS FRACCIONES  
TOXICAS DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL  
DE *A. ludeus* ..... 72

APENDICE 7 PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS DUNCAN PARA LA  
INTERACCION ENTRE 7 CEPAS Y SUS FRACCIONES  
TOXICAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CON-  
TROL DE *A. obliqua*. ..... 73

## CONTENIDO DE CUADROS

CUADRO 1 AREA DE RECOLECCION DE LAS MUESTRAS .....	27
CUADRO 2 RESULTADOS OBTENIDOS POR NUEVE DIFERENTES CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> EN EL CONTROL DE LAS <i>Anastrepha sp.</i> .....	44
CUADRO 3 RESULTADOS DE LA MORTALIDAD PROMEDIO DE 5 CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> EN EL CONTROL DE <i>A. ludens</i> .....	49
CUADRO 4 ANALISIS DE VARIANZA REALIZADO EN BASE AL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN <i>Anastrepha ludens</i> .....	51
CUADRO 5 RESULTADOS DE MORTALIDAD PROMEDIO DE 7 CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> PARA CONTROLAR <i>A. obliqua</i> .....	55
CUADRO 6 ANALISIS DE VARIANZA REALIZADO EN BASE AL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN <i>A. obliqua</i> .....	56

## CONTENIDO DE FIGURAS

FIGURA 1 PASOS EN LA ESPORULACION DEL <i>B. thuringiensis</i> .....	17
FIGURA 2 DISPOSICION DE LA FRUTA INFESTADA EN RE- CIPIENTES PLASTICOS PARA LA OBTENCION DE PUPAS DE <i>Anastrepha sp.</i> .....	35
FIGURA 3 EFECTO PRODUCIDO POR 5 CEPAS DE <i>B. thurin- giensis</i> en <i>A. ludens</i> .....	46
FIGURA 4 EFECTO PRODUCIDO POR 7 CEPAS DE <i>B. thurin- giensis</i> EN <i>A. obliqua</i> .....	48
FIGURA 5 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PRODUCIDO POR 5 CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> EN <i>A. ludens</i> .....	50
FIGURA 6 PORCENTAJE DE MORTALIDAD PRODUCIDO POR 7 CEPAS DE <i>B. thuringiensis</i> EN <i>A. obliqua</i> .....	53
FIGURA 7 PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA CEPA 7A EN <i>A. ludens</i> .....	54
FIGURA 8 PORCENTAJE DE MORTALIDAD DE LA CEPA 7A EN <i>A. obliqua</i> .....	57

**BUSQUEDA, AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis*  
NATIVAS DE GUATEMALA, PARA EL CONTROL DE LAS ESPECIES DE *Anastrepha*  
*ludens* y *Anastrepha obliqua***

**SEARCH, ISOLATION AND SELECTION OF *Bacillus thuringiensis* NATIVE TO  
GUATEMALA, FOR THE CONTROL OF THE SPECIES *Anastrepha ludens* AND  
*Anastrepha obliqua***

**RESUMEN**

Las moscas de la fruta causan pérdidas incalculables en Guatemala, especialmente en los cultivos citrícolas y del mango, que cada día cobran más importancia, tanto por la demanda local como internacional. Debido a la capacidad de daño de estas plagas y a la dificultad para controlarlas, la expansión de estos cultivos se ha visto seriamente limitada, afectando negativamente el desarrollo frutícola a nivel nacional.

Entre tales moscas de la fruta las especies *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua* son consideradas plagas de importancia económica en el cultivo de la naranja (*Citrus sinensis*) y mango (*Mangifera indica*) respectivamente, sin embargo se carece de un programa de control integrado para tales especies siendo necesario un análisis de aquellos factores que intervienen en el control, entre ellos, el control biológico sobresale como una alternativa por su alta especificidad y mínimas consecuencias ecológicas desfavorables.

Fué por ello que el presente trabajo se orientó a buscar aislar, evaluar y seleccionar cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas en los suelos de Guatemala que controlaran las especies de *A.ludens* y *A.obliqua* en forma eficiente, considerando que el entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* ha sido una bacteria utilizada por muchos años en el control de plagas.

Durante el estudio, se realizó en los meses de octubre, noviembre y diciembre de 1990, 50 muestreos en 25 lugares diferentes del país, especialmente en aquellos lugares en los que el insecto plaga en estudio hubo causado daño.

Como resultado de tales muestreos fueron aisladas 14 cepas de *B.thuringiensis* pendiente su determinación taxonómica, las cuales juntamente con otras 38 cepas fueron sometidas a evaluación.

La prueba de bioensayos preliminar permitió seleccionar aquellas cepas efectivas en el control de cada especie, evaluando posteriormente 5 cepas en *A.ludens* y 7 cepas en *A.obliqua*. En tal evaluación fueron separadas cuatro fracciones tóxicas de cada cepa de *B.thuringiensis*, las cuales se obtuvieron al final de la esporulación, constituyendo a la vez los tratamientos a evaluar, juntamente con un testigo el cual fué de utilidad en el registro de la mortalidad debida por causas naturales.

Los resultados del porcentaje de mortalidad obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza con un diseño completamente al azar, con un arreglo combinatorio mostrando diferencias significativas, por lo que fué necesario realizar una prueba múltiple de medias "Duncan". Siendo la cepa 7A quien alcanzó los valores más altos de control.

Así mismo en el análisis entre las distintas fracciones evaluadas, resultó que la fracción tóxica insoluble en agua, es decir los cristales parasporales presentaron en promedio los valores de control más elevados, esto señala el amplio potencial de las cepas 7A y 4B para la aplicación a gran escala en el control de las moscas de las frutas.

## 2. INTRODUCCION

En los últimos años la fruticultura en Guatemala ha cobrado un mayor interés, debido a que las condiciones ecológicas permiten el desarrollo de cultivos tropicales exportables, contribuyendo así al fortalecimiento de la economía guatemalteca. Prueba de ello son los programas de diversificación de cultivos a nivel nacional impulsados por el Ministerio de Agricultura, el programa Moscamed y la iniciativa privada de Guatemala, que con datos preliminares estimados, reportan un área potencial de cultivo aproximada de 70,000 Ha (incluyendo la costa sur) para naranja (*Citrus sinensis*) y 315,000 Ha para mango (*Mangifera indica*), de la cual el área que se estima utilizada actualmente es alrededor de 18,690 Ha para naranja y 5,740 Ha para mango.

El aumento de las áreas frutícolas, trae consigo el incremento de las principales plagas que le producen daño económico, entre ellas " Las moscas de la fruta " especialmente *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.

Fué por ello que el presente trabajo se enfocó en la búsqueda, aislamiento, evaluación y selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas en los suelos de Guatemala para el control de las especies de *A.ludens* y *A.obliqua*

Se evaluaron para ello 52 cepas de *B.thuringiensis* mediante la utilización de bioensayos en cada especie plaga en estudio, de las cuales fueron seleccionadas por su efectividad 5 cepas para *A.ludens* y 7 cepas para *A.obliqua*. En cada cepa fueron separadas cuatro fracciones tóxicas producidas durante el proceso de esporulación de la bacteria, las que a la vez fueron los tratamientos a evaluar.

Los resultados obtenidos de porcentaje de mortalidad fueron sometidos a un análisis de varianza, utilizando un diseño completamente al azar con un arreglo combinatorio presentando diferencias estadísticas significativas por lo que fué necesario realizar una prueba múltiple de medias "Duncan".

La fase de aislamiento y selección de cepas de *B.thuringiensis* fué realizada en el Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial ( ICAITI ), siendo la formación y mantenimiento de las colonias de *Anastrepha* llevadas a cabo en el laboratorio " La Aurora " del programa Moscamed, contando con la asistencia técnica y económica del Organismo Internacional regional de sanidad agropecuaria. (OIRSA ).

### 3. DEFINICION DEL PROBLEMA

Las condiciones ecológicas en Guatemala, la demanda y los precios alcanzados en el mercado internacional, permiten el desarrollo de una gran cantidad de cultivos exportables; cultivos como el mango y la naranja han adquirido en los últimos años importancia económica dentro de la fruticultura a nivel nacional, reportando un área potencial de 70,000 Ha para la naranja y 315,000 Ha para mango.

El aumento de las áreas de producción, ha conllevado al aparecimiento de aquellas plagas que atacan estos cultivos, siendo estas " Las moscas de la fruta ", principalmente *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*, ocasionandose tanto pérdidas directas al cultivo como impactos socio-económicos incalculables, por su limitación a las exportaciones debido a las medidas cuarentenarias impuestas por aquellos países importadores

Actualmente se carece de un programa adecuado de control integrado para las moscas de la fruta, ya que tradicionalmente por muchos años el control químico ha sido el principal método de supresión de estas plagas.

Es conocido que el sobreuso de productos químicos ha ocasionado el surgimiento de plagas más resistentes así como el aparecimiento de nuevas, provocando disturbios ecológicos desfavorables, en muchos cultivos

Es necesario considerar todos los factores que intervienen en el control, entre ellos el control biológico, como una alternativa viable por sus ventajas tanto en el sistema ecológico en el que actúa, como para el hombre mismo.

Habiendo sido seleccionado el entomopatógeno *Bacillus thuringiensis* por ser una bacteria que por muchos años se ha usado en el control de plagas ( más de 200 especies ) mostrando mínimas consecuencias ecológicas por su alta especificidad.

#### 4. MARCO TEORICO

El control de los insectos en su sentido más amplio incluye cualquier cosa que haga difícil la vida de estos, que los mate o évite su incremento y que haga que sea laboriosa su diseminación en el mundo. El combate de los insectos puede realizarse de muchas maneras . ( Metcalf y Flint 1,982 ) (27).

##### 4.1 DESCRIPCION DE LAS ESPECIES PLAGA EN ESTUDIO

Las moscas de la fruta más perjudiciales se encuentran incluidas en los géneros *Ceratitis*, *Dacus*, *Anastrepha*, *Rhagoletis* y *Toxotripa* (28 ).

Las hembras ovipositan a través de la cáscara de la fruta poniendo sus huevecillos en forma solitaria o en grupos. Al eclosionar , las larvas empiezan a alimentarse formando galerias en la pulpa siendo fácilmente localizadas en frutos por madurar. Al terminar su desarrollo abandonan el fruto haciendo orificios regulares que a veces estan rodeados por un área de consistencia blanda.

La salida de la larva generalmente coincide con la caída normal de la fruta, la lluvia al golpear el fruto provoca en forma espectacular la salida de las larvas, los ciclos biológicos varían en relación a la humedad, temperatura y hospedante.

Las larvas al abandonar el suelo suelen enterrarse a una profundidad de 2 - 8 centímetros generalmente, pero en relación a la textura del suelo pueden aumentar esta profundidad.

4.1.1 *Anastrepha ludens* (Loew)

Clasificación taxonómica:

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Trypetidae ( Tephritidae )

Genero: Anastrepha

Especie: ludens

Nombre común: Mosca de la fruta, mosca mejicana de la fruta.

Esta especie encuentra condiciones apropiadas en los suelos con pH neutro a ligeramente ácido para empupar ( 13 ).

El ciclo de vida que posee es el siguiente:

Huevecillo	larva	pupa	fecundidad
1 - 4 días	10 - 25 días	20 - 25 días	100 - 800 huevecillos.

Pudiendose obtener de cuatro a ocho generaciones al año .

Entre los principales hospederos se encuentra:

Mandarina	<i>Citrus nobilis</i>
Naranja agria	<i>Citrus aurantium.</i>
Naranja dulce	<i>Citrus sinensis.</i>
Mango	<i>Mangifera indica</i>
Guanaba	<i>Annona muricata</i>
Anona	<i>Annona heyessi.</i>
Mamey	<i>Mammea americana.</i>

Manzano	<i>Pyrus silvestris.</i>
Membrillo	<i>Cydonia oblonga.</i>
Chirimoya	<i>Annona cherimola.</i>
Chicozapote	<i>Achras zapota.</i>
Zapote	<i>Casimirca edulis.</i>
Jinicuil	<i>Inga jinicuil</i>
Durazno	<i>Frunus persica</i>
Pera	<i>Pyrus communis</i>
Toronja	<i>Citrus grandis.</i>
Arrayán	<i>Psidium sarturiana.</i>
Granada	<i>Punica granatum.</i>

#### 4.1.2 *Anastrepha obliqua* ( Macquart ).

Clasificación taxonómica:

Clase: Insecta

Orden: Díptera

Familia: Trypetidae ( Tephritidae )

Género: Anastrepha

Especie: obliqua

Nombre común: Mosca de la fruta, mosca de la fruta de las indias occidentales

Ciclo de vida:

Huevecillo	Larva	Pupa	Fecundidad
1 - 4 días	10 - 25 días	10 - 15 días	100 - 800 huevecillos

Entre los principales hospederos se encuentran:

Mango *Mangifera indica*

Guajaba *Psidium guajava*

Jobo	<i>Spodias mombin</i>
Pomarrosa	<i>Eugenia jambos</i>
Pitanga	<i>Eugenia uniflora</i>
Nispero	<i>Eriobotrya japonica</i>

Es una especie multivoltina ya que posee de cuatro a ocho generaciones al año.

Cada uno de los ciclos de vida dependen directamente de las condiciones ambientales ( 28 )

En lo que respecta a la dinámica de la población, estas disminuyen con el establecimiento de las lluvias y las época seca, no influyendo significativamente la altitud a la que se encuentre; estudios realizados han demostrado que no existen diferencias entre las altitudes comprendidas entre los 430 - 1250 msnm.(7)

Los factores ambientales constituyen un factor importante en la abundancia de individuos. Bateman, 1972 ( 5 ) cita que la sobrevivencia de las pupas de *A. ludens* se ve reducida por el bajo contenido de humedad en el suelo, teniendo una reducción de las poblaciones en años secos.

En regiones tropicales y subtropicales la temperatura ambiental se evidencia en el desarrollo de los estados inmaduros ( 5 ).

## 4.2 DESCRIPCION DE LA BACTERIA EN ESTUDIO

### 4.2.1 HISTORIA

*Bacillus thuringiensis* fué descrito por primera vez en 1902 en Japón como el organismo causal de la enfermedad en larvas del gusano de seda, denominando el agente causal como *Bacillus satta* por Ishiwata ( 24, 29, 21 ).

Sin embargo el verdadero descubrimiento del *Bacillus thuringiensis* fué hecho en Alemania por Berliner alrededor de 1910 (24) - 1915 (29, 21 ) en donde fué aislado el *B.thuringiensis* de la larva de *Ephestia kuhniella* proveniente de una fábrica situada en el distrito de Thuringia. A pesar que Berliner observó las inclusiones parasporales no las relacionó con la toxicidad producida

La producción comercial comienza en Francia en 1938 bajo el nombre sporeine.®

Trabajos realizados por Hannay , 1953, en Canada sugieren la actividad del cristal parasporal como el agente tóxico, siendo confirmado por Angus 1954, demostrando en 1955 Hannay y Fitz - James, la consistencia proteica del cristal (24, 29, 21).

Una nueva era en la historia de esta bacteria comienza con el descubrimiento de la actividad contra las principales plagas dentro del orden lepidóptera.

Prosiguieron los esfuerzos por aislar nuevas cepas de *B.thuringiensis* logrando en 1976 el aislamiento de una nueva cepa activa contra larvas de mosquito y la mosca negra, siendo esta cepa aislada del agua en el desierto de Negev, Israel a la cual se le denominó *Bacillus thuringiensis* H-14 o var. *israelensis* (24, 25). Otro descubrimiento importante fué hecho en 1963 por Krieg y colaboradores con el aislamiento de la cepa denominada *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis* (24) y la subespecie San Diego (22) las cuales son activas contra algunas larvas de insectos pertenecientes al orden coleóptera.

Recientemente en análisis genéticos mediante la localización de genes codificados por la delta-endotoxina se ha logrado obtener plantas transgénicas en tabaco, tomate, papa y maíz (24, 4, 34), las cuales actualmente están siendo sujetas a intensas pruebas de campo logrando resultados altamente satisfactorios.

El mercado del *B.thuringiensis* actualmente es difícil de estimarlo, sin embargo la utilización de cepas en el control de lepidópteros en la agricultura, horticultura y área forestal se calcula que anualmente oscila entre 10,000 - 50,000 toneladas (24).

#### 4.2.2 TAXONOMIA Y CLASIFICACION

De acuerdo a la clasificación de bacterias según Bergey 1974, *Bacillus thuringiensis* (berliner) pertenece a la familia Bacillacea, Género *Bacillus* siendo estos aerobios, gram-positivos, formadores de esporas.

*Bacillus thuringiensis* es una bacteria típica del suelo distinguible de especies cercanas como *B. cereus* y *B. anthracis*, debido a la presencia de una inclusión parasporal que aparece durante la esporulación (33), dicha inclusión parasporal o cristal generalmente tiene forma de diamante, pero en algunas especies tiene forma de rombo, cubo (3) o bien puede ser amorfo como en el caso de la variedad israelensis (*B.t.i*) (24, 29). Por lo general cada esporangio contiene un cristal, separado de la pared celular y de la spora, al parecer este persiste indefinidamente, es de naturaleza proteica, conteniendo un porcentaje mayor de 17 % en nitrógeno, y cuando menos 17 aminoácidos (3, 2).

La inclusión parasporal o cristal presente en la bacteria se tiñe fácilmente con colorantes biológicos y con facilidad se observa por medio de un microscopio de fases.

Con el descubrimiento de nuevas cepas de *Bacillus thuringiensis* fue necesario clasificarlas, utilizando en 1962 por Barjac y Bonnefou la primera clasificación basada en el antígeno flagelar H. Este método demostró ser muy útil en cuanto a la clasificación de cepas, actualmente han sido identificadas 30 diferentes serotipos pudiendo apreciarse algunos serotipos importantes en el apéndice 1. Este método ha sido una herramienta muy útil en cuanto a la clasificación de cepas individuales, sin embargo se discute de este método el no poder reflejar características genéticas de la delta-endotoxina, ni las propiedades insecticidas.(24)

Otras clasificaciones han sido propuestas siendo unas basadas en tipos y modelos de ácido graso, siendo finalmente en 1989 cuando Hofte y Whiteley propusieron un sistema de clasificación basado en la secuencia genética y del espectrum de actividad de cada cepa, siendo los genes divididos en cuatro grandes clases.

TIPO DE GEN	ACTIVIDAD
CRY I	LEPIDOPTERA
CRY II	LEPIDOPTERA
CRY III	COLEOPTERA
CRY IV	DIPTERA

La situación actual de la clasificación es satisfactoria ya que se puede por un lado agrupar al microorganismo y por el otro sus genes pueden ser caracterizados independientemente (24).

### 4.2.3 TOXICIDAD

Aoki y Chigasaki (1915) describieron la actividad de la bacteria aislada de la larva del gusano de seda por Ishiwata, así como la enfermedad ocasionada cuando esta era ingerida por la larva. Ellos fueron los primeros en establecer que solo los cultivos ya esporulados eran patogénicos al ingerirse por el insecto. En 1951 Steinhaus, Jerrel en 1954 y Hannay 1953 establecen un enlace entre la patogenicidad contra larvas de lepidópteros y la presencia de inclusiones parasporales.

Angus (1954, 1956) demostró satisfactoriamente que solo el cristal o su solución alcalina eran tóxicos en larvas de *Bombix mori*, que la espora sola, no era tóxica, así como que el cristal era activamente tóxico únicamente cuando este era ingerido por la larva ( 21, 3 ).

De Bach 1981 (3) indica que la mayoría de los insectos (larvas de lepidópteros ) atacados por *Bacillus thuringiensis* manifiestan una sintomatología, siendo esta que tales insectos se vuelven perezosos, ya no se alimentan y mueren en un lapso de veinticuatro a setenta y dos horas, tornándose de color café oscuro y negro, quedando el insecto momificado .

Actualmente dentro de la actividad tóxica de la bacteria se ha podido establecer la presencia de siete diferentes toxinas denominadas

$\alpha$  - Exotoxina, lecitinasa o Fosfolipasa C

$\beta$  - Exotoxina, termoestable

$\gamma$  - Exotoxina , enzima no identificada aún.

Toxina soluble al agua

Toxina inestable o lábil

Exotoxina o "mouse factor"

$\delta$  - Endotoxina o cristal parasporal proteico (29)

Aunque hay que hacer notar que no todas las cepas de *B. thuringiensis* poseen las siete toxinas antes mencionadas, sino más bien algunas de ellas varían en cada cepa.

$\alpha$  - Exotoxina (lecitina fosfolipasa C)

Se ha encontrado que tal exotoxina es acumulada durante la fase de crecimiento exponencial de algunas variedades, siendo inestable al calor y capaz de provocar rompimiento en muchos tipos de células (29).

$\beta$  - Exotoxina o Thuringiensin

En 1959, Connell y Richards reportan el descubrimiento de un compuesto estable al calor producido por el *B. thuringiensis*

La  $\beta$  - Exotoxina tiene la característica de ser segregada por algunas variedades durante el crecimiento exponencial.

La  $\beta$  - Exotoxina es conocida también por su alta actividad contra algunos dípteros "Fly factor" y otros insectos. Actúa bloqueando la mitosis celular, siendo derivado de la adenosina, ejerce un efecto inhibitor específico de la polimerasa de ARN dependiente del ADN de bacterias y en células de mamíferos. El uso de la  $\beta$  - exotoxina como insecticida ha sido rechazada en norte-américa y Europa por causar un aumento de aberraciones en los cromosomas de células de sangre humana. (29, 20)

## δ - Endotoxina

La delta - endotoxina conocida actualmente como el cristal proteico, es activa por la mayor parte de cepas de *B.thuringiensis* contra insectos del orden lepidóptera, tal endotoxina es producida durante el proceso de esporulación ( ver figura 1 ), sin embargo la función del cristal dentro de la bacteria y su origen bioquímico exacto son aún desconocidos (29).

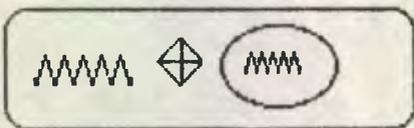
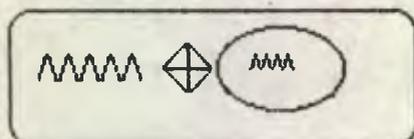
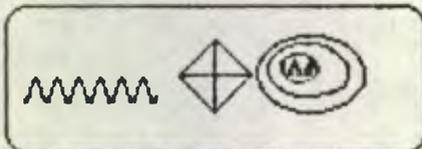
El cristal parasporal esta compuesto de subunidades glicoproteicas (5% de carbohidratos ) alcanzando un peso molecular que varia de 130,000 daltons (29) - 140,000 daltons (22).

Los genes del cristal proteico generalmente se encuentran localizados en uno o más plásmidos (13,33,25 ) que varían de tamaño ( de 1.5 a 180 Mdaltons ) y en número (2 a 17) dependiendo de la especie (33). En el caso del *Bacillus thuringiensis var israelensis* se le atribuye que la información para la elaboración de la delta-endotoxina se encuentra en un largo plásmido de 72 Kdaltons causando una rápida citólisis en células epiteliales del intestino del insecto (25).

Normalmente las proteínas ( 130,000 - 140,000 daltons ) son convertidas por enzimas proteolíticas en el intestino medio del insecto a pequeños componentes tóxicos, el tamaño de dichos componentes oscila alrededor de los 60 kilodaltons (22).

En la delta-endotoxina de muchas variedades de *B.thuringiensis* ( exep- tuando finitimus, pakistani, dakota, indiana, kumamotoenis y tochiensis) se ha encontrado que su patogenicidad hacia varias especies de insectos afecta principalmente en su estado larvario. Hasta el momento se conocen tres espectros diferentes de actividad o patotipos. (24,22, 29).

Figura 1. PASOS EN EL PROCESO DE ESPORULACION DEL *Bacillus thuringiensis*

FASE	DESCRIPCION	
I		<ul style="list-style-type: none"> <li>- CAMBIOS NUCLEICOS</li> <li>- CONDENSACION DE LA CROMATINA NUCLEAR EN FILAMENTOS AXILARES</li> <li>- FORMACION DEL FILAMENTO AXIAL</li> </ul>
II		<ul style="list-style-type: none"> <li>- DISTRIBUCION DE LA CROMATINA EN CADA LADO DEL SEPTUM</li> </ul>
III		<ul style="list-style-type: none"> <li>- APARICION DE LA INCLUSION OVOIDE Y DEL CRISTAL</li> </ul>
IV		<ul style="list-style-type: none"> <li>- FORMACION DE LA PARED CELULAR</li> <li>- FORMACION DEL CORTEX Y RECUBRIMIENTO DE LAS ESPORAS.</li> </ul>
V		<ul style="list-style-type: none"> <li>- MADURACION DEL CRISTAL Y DE LA ESPORA</li> </ul>
VI		<ul style="list-style-type: none"> <li>- PROCESO DE REFRACTIBILIDAD</li> <li>- FIJACION DE CALCIO DIPCOLINATO EN LA PARED DE LA ESPORA Y TERMOESTABILIDAD</li> <li>- LISIS DE ESPORANGIOS</li> </ul>

FUENTE: ESTUDIOS REALIZADOS POR FITZ-JAMES (1959) ( 21 ).  
G. ROWE, A. MARGARITIS ( 29 ).

- a) lepidópteros ( Patotipo A )
- b) díptera ( Patotipo B )
- c) coleóptera ( Patotipo C )

La actividad en dípteros ( especialmente mosquitos de la familia: culicidae ) ha sido correlacionada con la presencia de cristales de forma cuboide fácilmente distinguibles del cristal bipiramidal característico del *B. thuringiensis*, tal cristal activo contra dípteros y mosca negra además de ser heterogéneo en su forma, lo es en su composición; caracterizándole cuatro componentes principales cuya masa molecular es de 134, 126, 72 y 27 Kdaltons (22).

De manera general podemos mencionar la correlación encontrada con polipéptidos de masa 134, 126 y 72 kilodaltons en cuanto a su actividad contra mosquitos, siendo el cuarto componente del orden de los 27 kilodaltons responsable de la actividad citolítica no específica (22).

Cepas de *Bacillus thuringiensis var tenebrionis* y *Bacillus thuringiensis var san diego* recientemente aisladas se caracterizan por mostrar características marcadamente diferentes con relación a aquellas cepas cuyo cristal es activo contra lepidópteros, en cuanto a la estructura y las propiedades químicas del cristal.

La especificidad encontrada en el *B. thuringiensis* ha sido considerada por algunos autores como limitante para su utilización como pesticida, sin embargo la multiplicidad de cristales proteicos actualmente identificados y sus efectos sinérgicos encontrados brindan una oportunidad para el aumento de su uso.

#### 4.2.4 MODO DE ACCION DE LA ENDOTOXINA

El modo de acción de la endotoxina ( el cristal parasporal ) ha sido objeto de estudio desde 1959. Numerosas investigaciones se han realizado siendo difícil su interpretación por la diversidad de las especies susceptibles y las variaciones observadas en cuanto a la eficacia del cristal de diferentes variedades de *B. thuringiensis*. (21).

Existen tres formas diferentes por las cuales las bacterias cristalíferas pueden matar al insecto huésped, designadas como tipos I, II, III:

##### TIPO I (tipo *Bombix mori* )

El valor del pH del intestino del insecto deberá estar en 10 o más alto. Matan al insecto a los pocos minutos ( 5 - 20 ) después de la ingestión del bacilo esporulado, presentando una parálisis del intestino medio, seguido de una parálisis general de una a siete horas después. La parálisis general es acompañada por un incremento en el pH de la sangre de 1 a 1.5 lo cual indica que hay una filtración del material alcalino del intestino a la sangre.

##### TIPO II ( *Pieris brassicae* ) .

El valor del pH del intestino del insecto deberá estar alrededor de 9.5 . En este tipo de acción no ocurre un incremento en el pH, pero hay una parálisis del intestino y el insecto muere a los dos o cuatro días con una parálisis general ( es la más común ).

TIPO III ( *Anagasta kuhniella* ).

El valor del pH del intestino del insecto deberá encontrarse por debajo de 8.4 Solo se conoce un insecto *Anagasta kuhniella* el cual muere de los dos a cuatro días con los síntomas de parálisis general, no muere como en los casos I y II, parece ser que para causar la muerte la espora debe germinar en presencia del cristal proteico, creciendo en el intestino medio. ( 3, 21 ).

La protoxina necesita ser ingerida por el insecto susceptible, disolviéndose en un medio alcalino en el intestino del insecto y convirtiéndose dichas protoxinas en componentes tóxicos activos más pequeños de aproximadamente 60,000 daltons; subsecuentemente las moléculas tóxicas pasan a través de la membrana peritrófica (24). Similar activación se da en proteínas de 72 Kilodaltons en el *B.thuringiensis var. israelensis* (22); esta activación proteolítica es el primer paso en el proceso de envenenamiento precedido por la ingestión del cristal, subsecuentemente toman lugar una serie de eventos produciéndose en larvas de lepidóptero, una parálisis del intestino y de las partes bucales.

Estudios realizados han demostrado que las células epiteliales del intestino medio de la larva susceptible es el lugar donde actúa primero la toxina (22); efectos similares se encuentran en larvas de dípteros variando en las manifestaciones de toxemia entre los diferentes grupos de insectos. Como mencionamos anteriormente, el sitio de acción se encuentra en la membrana epitelial del intestino donde los polipéptidos se enlazan con receptores específicos, la presencia de tales receptores ha sido ampliamente demostrada, sin embargo la delta - endotoxina de diferentes variedades parece reconocer diferentes receptores; hasta la fecha dichos receptores no han sido aislados ni caracterizados ( 29, 11 ).

La acción del *B.thuringiensis* a nivel celular consiste en el hinchamiento y destrucción de la microvili, la hinchazón celular, la desintegración progresiva de los organelos celulares y una intravacuolación intracelular general (22,24,10), provocando un descontrol de la permeabilidad del insecto seguido de un intercambio entre los componentes de la hemolinfa y el contenido intestinal siendo letal para la larva del insecto. (24)

Hay efectos hemolíticos, citolíticos y neurotóxicos ocasionados especialmente por el *B.thuringiensis var israelensis* (22, 30, 9, 10) en polipéptidos de 27 kilodaltons cuyo mecanismo difiere del presentado por los otros cristales proteicos. Thomas y Ellar en 1983 reportan la posible interacción de la toxina con fosfolípidos de la membrana celular en dípteros, induciendo un deterioro del reordenamiento de lípidos seguido de una desorganización de la estructura de la membrana celular (22).

#### 4.2.5 APLICACIONES DEL *Bacillus thuringiensis*.

Alrededor de 200 especies de insectos principalmente lepidópteros son controlados por el entomopatógeno *B.thuringiensis*, excluyendo a la variedad israelensis la cual es activa contra mosquitos y la mosca negra (orden díptera).

En algunas aplicaciones agrícolas es utilizado exitosamente contra defoliadores, protegiendo cultivos como algodón (principalmente), brócoli, repollo, coliflor, lechuga, tomate, viñedos, alfalfa, tabaco, sandía, etc.

En el campo forestal esta bacteria ha tenido una contribución enorme especialmente en países como Canadá en el control de especies como: Gypsy moth (*Cymenaria dispar*) palomilla gitana; Spruce budworm (*Chor-*

*ristoneura fumiferana*) gusano de la yema del pinabete; Western tent caterpillar ( *Melacosoma californicum* ); Browntail moth ( *Eupractic chrysorrhoea* ) palomilla de cola café; Bag worm ( *Thyridopteryx ephemeraeformis* ) gusano de bolsa, etc. Se ha desarrollado formulaciones líquidas altamente potentes ( por encima de 12.7 billones UI/L), teniendo el *B.thuringiensis* como el único organismo patógeno registrado para el control del Spruce budworm ( *Choristoneura fumiferana* ) gusano de la yema del pinabete.

Otra aplicación y quizá una de las más importantes lo constituye la utilización en el control de vectores de enfermedades para el hombre, especialmente en la variedad israelensis, se han desarrollado formulaciones para el control de 72 especies de mosquitos ( del género *Culex* y *Anopheles* principalmente ) y 27 especies de la mosca negra (Simúlido del orden Díptera ) (29 ).

#### 4.3 POBLACION DE BACTERIA EN EL SUELO

Buckman, 1977, (6) reporta que la mayor población de bacterias en el suelo radica en horizontes superiores siendo su número variable debido a condiciones de temperatura, humedad, aereación, la calidad y clase de materia orgánica que sean o no favorables, la concentración de iones hidrógeno en el suelo, así como la cantidad de calcio intercambiable.

Es cierto que la cantidad de bacterias en el suelo es muy grande, posiblemente tanto como 3 ó 4 billones para un gramo de suelo. Se estima que de 450 a 560 Kg de masa bacteriana vive en el espesor arable de una hectárea ( 6 ).

*Bacillus thuringiensis* es un microorganismo típico del suelo, distinguible de especies de *bacillus* cercanas, fácilmente aislado del suelo ya sea por selecciones de acetato (26, 32, 18) o bien utilizando el medio basal (32) entre otros.

Investigaciones realizadas en cuanto a la distribución del *Bacillus thuringiensis* por Martin y Travers (26) muestran resultados positivos en el aislamiento de muestras de suelo provenientes de 30 países distribuidos en cinco continentes, siendo en Asia donde se encontró una mayor abundancia.

La presencia de *Bacillus thuringiensis* en el suelo no mostró correlación en el control de insectos presentes (26, 23), siendo raramente o nunca desencadenada una epizootia, a no ser de provocarse por condiciones externas favorables tales como aglomeraciones de insectos. Sin embargo, las cepas de *B.thuringiensis* aisladas producen toxinas altamente eficientes en el control de ciertas plagas (23) llegando actualmente a producirse comercialmente por año aproximadamente 10,000 - 50,000 toneladas, a partir principalmente de cepas activas contra lepidópteros siendo para aquellas cepas activas contra dípteros una producción anual alrededor de 1,000 toneladas (24).

## 5. OBJETIVOS

Buscar, aislar, evaluar y seleccionar cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas en los suelos de Guatemala para controlar las especies de *Anastrepha ludens* o *Anastrepha obliqua*.

## 6. HIPOTESIS

6.1 Existe al menos una cepa de *Bacillus thuringiensis* nativa en los suelos de Guatemala que controle las especies de *Anastrepha ludens* o *Anastrepha obliqua*.

6.2 Por lo menos una de las cuatro fracciones tóxicas de *B. thuringiensis* prevea un porcentaje de mortalidad diferente que las demás en el control de *A. ludens* o *A. obliqua*.

## 7. METODOLOGIA

### 7.1 OBTENCION DEL MICROORGANISMO

#### 7.1.1 Localización del áreas de muestreo:

Las muestras de suelo sujetas a análisis fueron tomadas en huertos frutales de Mango y cítricos que presentaron ataques de las plagas bajo estudio, también se muestreó en mercados y lugares donde había sido almacenada fruta, ya que estudios anteriores muestran una mayor incidencia de *B.thuringiensis* en tales lugares (32).

Las áreas de recolección de muestras para cada cultivo fueron las siguiente:

#### Mango:

- Sur - occidente ( Retalhuleu )
- Sur - oriente ( Chiquimulilla )
- Sur ( Escuintla )
- Oriente ( Zacapa )

#### Cítricos:

- Norte ( Alta Verapaz )
- Centro ( Baja Verapaz )
- Sur ( Sacatepéquez, Chimaltenango )
- Sur - occidente ( Retalhuleu )

De las áreas mencionadas anteriormente, se seleccionaron 25 lugares de recolección diferentes, distribuidos en todo el país (ver cuadro 1 ), de las cuales se obtuvo 50 muestras de suelo.

Cuadro 1. Area de recolección de las muestras ( ver detalle de cada lugar de muestreo en el apéndice 2 ).

Número de muestra		Departamento
1	Sur	Santa Rosa
2	Sur	Sacatepéquez
3	Sur	Chimaltenango
4	Sur	Santa rosa
5	Sur	Escuintla
6	Sur	Escuintla
7	Sur	Escuintla
8	Norte	Alta Verapaz
9	Norte	Alta Verapaz
10	Norte	Alta Verapaz
11	Centro	Baja Verapaz
12	Centro	Baja Verapaz
13	Centro	Baja Verapaz
14	Sur	Sacatepéquez ( Antigua Guatemala )
15	Sur	Chimaltenango
16	Oriente	Zacapa
17	Sur	Chimaltenango
18	Sur	Chimaltenango
19	Sur	Chimaltenango
20	Sur	Chimaltenango

21	Oriente	Zacapa
22	Sur-occidente	Retalhuleu
23	Norte	Alta Verapaz
24	Centro	Baja Verapaz
25	Centro	Guatemala

---

#### 7.1.2 Toma de muestras :

En cada lugar de muestreo fueron recolectadas de tres a cinco submuestras por manzana, obteniendo un total de 50 - 100 gramos de suelo, provenientes de horizontes superiores ( 0 - 30 centímetros ). Mediante la utilización de espátulas se colocaron en bolsas plásticas identificadas, trasladándose al laboratorio del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial (ICAITI ).

La toma de muestras fué realizada durante los meses de octubre, noviembre ( meses en los que las poblaciones de moscas de la fruta en condiciones naturales alcanzan los valores más altos y comienzan a declinar), diciembre de 1990 y enero de 1991.

#### 7. 1.3 CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* :

Adicionalmente a las cepas obtenidas, se contó con 26 cepas aisladas de suelo guatemalteco en trabajos de investigación realizados en 1990 (32)( ver procedencia de cada cepa en el apéndice 3), así como también se dispuso de 12 cepas de *B.thuringiensis* conocidas, provenientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de norte-américa, Brownsville Texas, ( ver información de cada cepa en el apéndice 4 ) propiedad del ICAITI.

## 7.2 CONDICIONES DE CRECIMIENTO.

### 7.2.1 AISLAMIENTO DEL MICROORGANISMO:

Posterior de la colección de muestras de suelo se llevó a cabo la fase de aislamiento en el laboratorio de microbiología del ICAITI de acuerdo a la siguiente metodología.

- Se agregaron dos gramos de suelo en treinta mililitros del medio basal (MB).

#### MEDIO BASAL:

material	Cantidad
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.3 g/l
MnSO <sub>4</sub> . H <sub>2</sub> O	0.05
CaCl <sub>2</sub>	0.089
ZnSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.005
CuSO <sub>4</sub> . 5H <sub>2</sub> O	0.005
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.005
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.0
Glucosa	1.0
Glutamato o ácido cítrico	2.0
K(OH)	Lo necesario para ajustar el pH a 6.8 - 7.0

- Se incubó a 28 °C por 4 hrs agitándolo a 250 revoluciones por minuto (rpm) permitiendo de esta manera el crecimiento y desarrollo de aquellas bacterias presentes en la muestra.
- Después de 4 hrs las muestras se sometieron a un tratamiento térmico: calentándolas en baño maría a 80 °C por 10 minutos y luego bajando

inmediatamente la temperatura a 5 °C en un baño de hielo por 10 minutos. Esto permite la destrucción de las bacterias que no esporulan y permite la esporulación de aquellas que si lo hacen (*E. thuringiensis*).

- De la muestra tratada anteriormente se tomó una alícuota de 1 ml y se realizó la siembra en cajas petri con 15 ml del medio agar T3.

#### MEDIO AGAR T3:

materiales	cantidad	
Triptona	3.0	g/l
Triptosa	2.0	
Extracto de levadura	1.5	
Solucion buffer de fosfatos de Na <sup>+</sup>	250.0	ml al 0.2M /l
a pH de 6.8.		
MgCl	0.005	g
Agar base	15.0	

- Cada caja de petri fué colocada en la incubadora por cuatro días, con una temperatura constante de 28 °C
- Por medio de un microscopio estereoscópico se observaron las colonias resultantes, de acuerdo a la morfología se hizo una primera separación seleccionando las posibles colonias de *E. thuringiensis*. Las colonias seleccionadas se cultivaron de nuevo en agar T3 a 28 °C para obtener un mejor crecimiento y eliminación de las colonias contaminadas y contaminantes.
- Después de tres días de incubación se hicieron preparaciones en

porta-objetos para observar las colonias bajo el microscopio, con aumento de 1000 X , identificando los cristales típicos del *B. thuringiensis* teñido con el colorante azul de Coomasie por tres minutos.

#### COLORANTE AZUL DE COOMASIE :

materiales	cantidad
Comasie brilliant blue	0.25 %
Etanol	50.0 %
ácido acético	7.0 %

- La presencia del cristal parasporal constituyó un elemento de juicio importante para identificar una cepa como *Bacillus thuringiensis*.

#### 7.2.2 FERMENTACION DEL *Bacillus thuringiensis*

- Se transfirió acépticamente con un asa llena de bacterias de la colonia de *B. thuringiensis* aislada, a un erlenmeyer con 100 ml del medio de cultivo TPB. Inmediatamente se colocó en una incubadora con agitador horizontal por 24 hrs a 340 (rpm) revoluciones por minuto y a 30 °C. Los erlenmeyers utilizados poseen tabiques internos con el propósito de proporcionar una mejor aireación en la agitación.

#### MEDIO TPB

Materiales	Cantidad
Caseina Digestiva	20.0 g/l
Dextrosa	2.0 g
Cloruro de sodio	5.0
Fosfato de sodio	2.5

-Pasadas 24 hrs se tomaron y transfirieron del cultivo anterior (TPB) 2 ml (2 %) a un segundo medio TPB por 24 hrs, a 340 rpm y a 30 °C.

- Seguidamente se transfirieron 2 ml del segundo medio de cultivo (TPB) a 100 ml del medio B4. Utilizando erlenmeyers con el mismo mecanismo de fermentación mencionado anteriormente, revisando a las 24 hrs a través del microscopio el estado de la esporulación, producción de cristales y rompimiento celular. La fermentación se completó a las 96 hrs, tiempo en el que se inició la separación de protoxinas y toxinas.

-Para la tinción del cristal se utilizó el colorante azul de Coomasie al 0.25%

#### MEDIO B4

##### A. Materiales.

Harina de semilla de algodón	10.0 g/l
Peptona tipo II	2.0
Dextrosa	15.0
Extracto de levadura	2.0

Ajustar el pH a 6.8 - 7.0

Adicionar 2 ml de la solución de minerales que se describe a continuación.

##### B. Solución de minerales

	gr/ 10 ml
MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	1.5
FeSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.1
MnSO <sub>4</sub> * H <sub>2</sub> O	0.1
ZnSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	0.1
CaCO <sub>3</sub>	5.0

### 7.3 SEPARACION DE LAS PROTOXINAS Y TOXINAS:

El producto del proceso final de fermentación se trató de la manera siguiente:

- Se verificó el pH, ajustandose a 7.0 con ácido clorhídrico al 0.1 N, afinando a 100 ml con agua destilada.
- Posteriormente se hizo girar en centrífuga a 1,000 rpm durante 5 minutos, separando los ingredientes del medio B4 insolubles, sedimento que fue desechado, tomando todos los productos de la fermentación en el sobrenadante, donde se encontraban las endotoxinas y exotoxinas.
- Del sobrenadante obtenido en el procedimiento anterior se hizo girar en centrífuga a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C, separando de esta manera los compuestos insolubles (sedimento) y aquellos solubles en el medio, el cual se concentró a través del proceso de ultrafiltración y se conservó en refrigeración (A).
- Al sedimento obtenido se le realizaron dos lavados adicionales con agua destilada a 15,000 rpm durante 15 minutos a 4°C nuevamente, resuspendiéndose en un solo tubo con 10 ml de agua destilada, conteniéndolo en ello las llamadas protoxinas o bien endotoxinas de la bacteria, refrigerándose posteriormente (B).
- Tanto (A) como (B) fueron divididas en dos fracciones, de las cuales una de las fracciones de A y B fueron sometidas a 120 °C durante 15 minutos a 15 PSI\*, obteniendo de esta manera (C) y (D) siendo estas las cuatro fracciones evaluar.

---

\* PSI: libras por pulgada cuadrada

## 7.4 CONCENTRACION DE LAS SOLUCIONES TOXICAS

La ultrafiltración, método conveniente para concentrar toxinas fué utilizado en la fracción soluble en agua, al final del proceso de fermentación (llamadas exotoxinas ).

Durante el proceso de ultrafiltración se llevó a cabo la remoción de moléculas tales como agua, sales y minerales a través de membranas semi-permeables, con el propósito de lograr una mayor concentración de la fracción tóxica. A tal método comúnmente se le llama ósmosis reversa, en el que los solutos y solventes de determinado tamaño son forzados a pasar a través de membranas especiales mediante altas presiones, regulando la presión en nuestro caso mediante la inyección de nitrógeno, reduciéndose el volumen inicial a un 33 %.

## 7.5 FORMACION Y MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS DE *Anastrepha sp.*

### 7.5.1 Formación de las colonias:

Para la formación de la colonia fué necesario recolectar muestras de naranja infestada de cultivos frutales, para el caso de *Anastrepha ludens* y Mango para el caso de *Anastrepha obliqua*, localizados en las zonas de muestreo antes mencionadas. Las muestras fueron llevadas al laboratorio del programa MOSCAMED " La Aurora ", en el que cada muestra fué colocada en recipientes plásticos. El primer recipiente estuvo provisto de un sustrato de arena mientras que el recipiente superior o segundo contenía un cedazo que soportaba la fruta y permitía la caída de las larvas a la parte inferior donde se encontraba dicho sustrato de arena, lugar donde empupaban las larvas ( ver figura 2 )

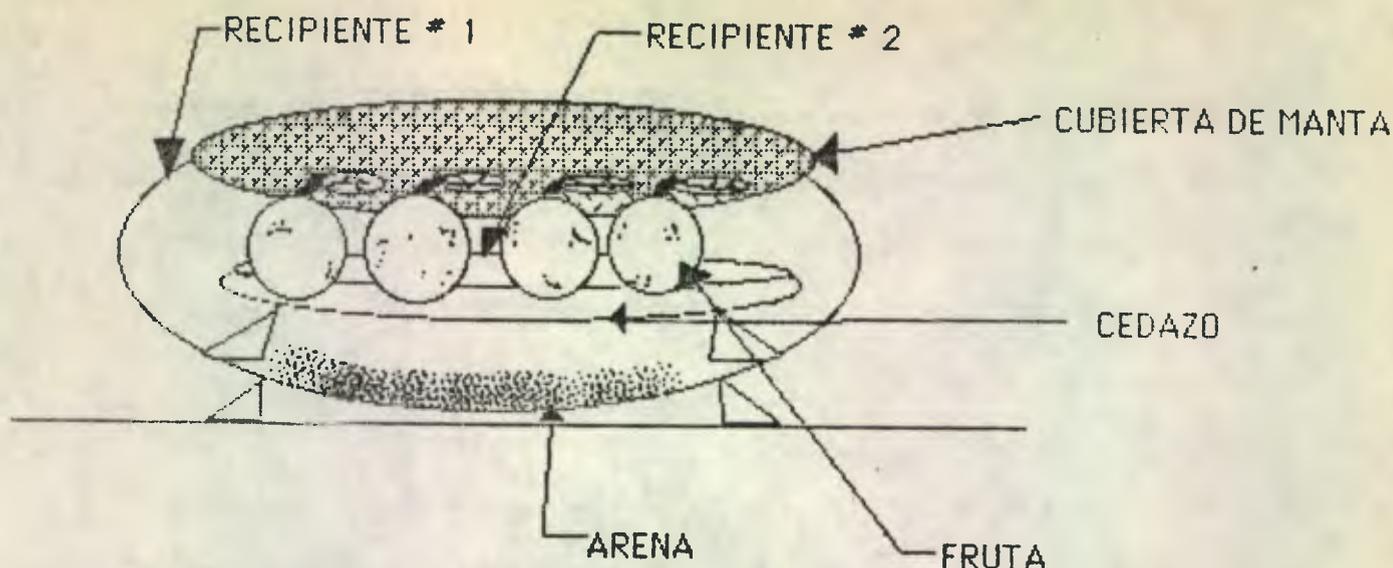


Figura 2. Disposición de la fruta infestada en recipientes plásticos para la obtención de pupas de *Anastrepha* sp.

Cada larva sale del fruto y atraviesa el cedazo para empupar en la arena llevándose posteriormente a cajas plásticas en donde con ayuda de taxónomos del programa "Moscamed" se identificaron las especies de interés en el estudio.

#### 7.5.2 MANTENIMIENTO DE LAS COLONIAS

El mantenimiento de las colonias se realizó de manera similar al procedimiento empleado en la formación, llevándose a cabo en medios naturales, siendo para nuestro caso en ambas especies de mosca, frutas de mango, en especial el denominado mango criollo o de coche (*Mangifera indica*).

Cada mango fue desinfectado externamente, como primer paso, lavándolo en una solución a base de benzoato de sodio, posteriormente se introdujeron a las colonias de *Anastrepha* para ser ovipositados. El tiempo de exposición fue de 48 hrs, retirando la fruta para ser colocada en recipientes plásticos en grupos de 3 a 4 mangos por recipiente. ( ver figura 2 )

El crecimiento y desarrollo de las larvas dentro de la fruta duró aproximadamente 22 días, pasado este tiempo la larva abandonó la fruta, y cayó a un recipiente provisto de arena (tanto *Anastrepha ludens* como *Anastrepha obliqua*, en recipientes separados), en el que pasa a una nueva etapa de desarrollo denominada pupa.

Periódicamente se tamizó la arena, recolectando las pupas ya formadas, las cuales se separaron en recipientes plásticos previamente identificados con la especie, la fecha de recolección y el número de pupas recolectado.

Durante la emergencia de cada adulto, a partir de la pupa, trascurrieron aproximadamente veinte días. Los mencionados adultos (ambos sexos) fueron cuidadosamente recolectados para su utilización en los bioensayos.

Las condiciones ambientales utilizadas en el mantenimiento de las colonias básicamente se mantuvieron constantes, a una temperatura que osciló entre 24 - 26 °C, con humedad relativa del 50%. Durante el día se iluminaron las colonias con luz artificial.

## 7.6 REALIZACION DE LOS BIOENSAYOS

### 7.6.1 Pruebas preliminares contra adultos de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.

Como una fase inicial de selección se contó con un lote de 26 cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas de los suelos de Guatemala aisladas en 1990 por la Licenciada Nina Stauder (32) como parte del estudio titulado: Aislamiento de cepas de *Bacillus thuringiensis* propias de Guatemala y

caracterización de la endotoxina. Así mismo, se evaluaron 12 cepas provenientes del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos de Norte-América, Brownsville, Texas, propiedad del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, adicionando finalmente a las cepas antes mencionadas 14 cepas aisladas como parte del presente estudio ( ver detalle en el apéndice 5 )

Cada cepa fué evaluada aisladamente para las especies de *A. judens* y *A. obliqua* en cajas plásticas, las cuales contenían: 20 adultos de *Anastrepha sp* (ambos sexos) de aproximadamente 1 - 2 días de edad, porciones de proteína hidrolizada ( En estado sólido ) de aproximadamente 1X1X0.5 centímetros como fuente de alimento, siendo renovada cada dos días la cepa a evaluar ( en estado líquido ) con micropipetas "Pasteur" de 1 ml de capacidad, suministrada en depósitos cilíndricos de 20 mm de altura y 10 mm de diámetro los cuales fueron sometidos a 15psi de presión y 120 °C durante 15 minutos, en el autoclave, previo a ser utilizados.

Se registró la mortalidad diariamente a lo largo de nueve días, seleccionando aquellas cepas que presentaron los mejores resultados en cuanto a control. De tal prueba 5 cepas fueron seleccionadas para el control de *A. judens* y 7 cepas para el control de *A. obliqua*, las cuales fueron evaluadas nuevamente.

Las condiciones ambientales dentro del laboratorio permanecieron constantes en el que, la temperatura osciló entre 24 - 26 °C y la humedad relativa en un 50 %.

#### 7.6.2 Pruebas finales

Las pruebas finales fueron realizadas con aquellas cepas



seleccionadas por presentar el mejor porcentaje de control en los ensayos preliminares efectuados para cada especie de *Anastrepha*.

Durante tales pruebas fueron evaluadas de cada cepa cuatro fracciones, que juntamente con el testigo constituyeron nuestras cinco modalidades, los cuales fueron replicadas tres veces y consistieron en:

- A. El primer sobrenadante separado del producto de la fermentación posteriormente de ser filtrado.
- B. El sedimento separado del producto de la fermentación.
- C. Tratamiento A, pasado por el autoclave.
- D. Tratamiento B, pasado por el autoclave.
- E. testigo absoluto.

En forma similar a las pruebas de selección, se utilizó recipientes plásticos, donde se colocaron 20 adultos de *Anastrepha* por modalidad, lo que dió un total de 100 adultos por cepa de *B.thuringiensis* evaluada para cada una de las tres repeticiones.

Fué suministrada proteína hidrolizada en raciones de 1X1X0.5 cms así como el tratamiento a evaluar a razón de 1 ml por recipiente, siendo este renovado cada 48 hrs. A diferencia del testigo, en el que se suministró agua destilada, este mismo fué de utilidad en el registro de la mortalidad debida por causas naturales a lo largo de la prueba, la cual duró nueve días.

#### 7.7 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se utilizó un diseño completamente al azar con arreglo combinatorio

4x7 para *A. obliquus* y 4x5 para *A. ludens*, consistiendo nuestra unidad experimental en una caja plástica conteniendo 20 adultos de *Anastrepha sp.*, con una porción de proteína hidrolizada de 1X1X0.5 cms como fuente de alimento y un depósito cilíndrico plástico de aproximadamente 20mm de altura y 10mm de diámetro, el cual contenía la fracción tóxica a evaluar, o bien en el caso del testigo, contenía únicamente agua esterilizada.

### 7.7.1 MODELO ESTADISTICO

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \epsilon_{ijk}$$

$\mu$  = efecto de la media general

$\alpha_i$  = efecto de la i-ésima fracción tóxica

$\beta_j$  = efecto de la j-ésima cepa

$\alpha\beta_{ij}$  = efecto de la interacción de la i-ésima fracción tóxica y la j-ésima cepa

$\epsilon_{ijk}$  = efecto del error experimental

### 7.7.2 DESCRIPCION DE LOS FACTORES Y MODALIDADES EVALUADAS

#### *A. ludens*

factor/ modalidad	1	2	3	4	5
A. Fracción tóxica	A	B	C	D	
B. Cepa	4b	7a	15a	18b	200

*A. obliqua*

factor/modalidad	1	2	3	4	5	6	7
A. Fracción tóxica	A	B	C	D			
B. Cepa	4b	5b	7a	15a	15b	151	190

## Descripción de las fracciones tóxicas

- 1.- A: El primer sobrenadante separado del producto de la fermentación posteriormente a ser filtrado.
- 2.- B: El sedimento separado del producto de la fermentación.
- 3.- C: Tratamiento A, pasado por el autoclave.
- 4.- D: Tratamiento B, pasado por el autoclave.

## 7.7.3 VARIABLE DE RESPUESTA

Como variable de respuesta se considera el porcentaje de mortalidad en cada una de las especies bajo estudio.

## 7.7.4 ANALISIS ESTADISTICO :

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza utilizando el diseño propuesto para ambas especies. Para el análisis realizado fueron registradas diferencias estadísticas significativas, por lo que fué necesario realizar una prueba de medias "Duncan" con el propósito de establecer que cepa (s) y fracción (es) tóxicas presentaron los mejores resultados.

Por la naturaleza de los resultados, fué necesario realizar una transformación de datos del tipo  $(X+1)^{1/2}$

## 8. RESULTADOS Y DISCUSION

### 8.1 AISLAMIENTO DE *Bacillus thuringiensis* DE MUESTRAS DEL SUELO

Se procesaron 50 muestras de suelo provenientes de 25 lugares distintos del país, siendo la región "sur" por presentar mayor incidencia de la plaga en estudio, en donde los muestreos fueron más numerosos, como se nota en el apéndice 2. Así mismo, casi la totalidad de cepas aisladas provienen de tal región, especialmente de los departamentos de Escuintla y Chimaltenango.

utilizado de preferencia el medio basal por su alta especificidad y eficiencia en el aislamiento del *B.thuringiensis*, se logró aislar tres cepas, las cuales presentaron inclusión parasporal de forma bipiramidal (cristal proteico) característico del *Bacillus thuringiensis*, que lo diferencia de cepas cercanas como *Bacillus cereus* y *Bacillus anthraci*. Tales cepas fueron aisladas en distintos lugares del departamento de Chimaltenango.

Las colonias de las tres cepas de *B.thuringiensis* aisladas, dentro de otras características, presentaron una elevación plana de color cremoso siendo estas opacas, con bordes irregulares ligeramente fimbriados, sin presencia de pigmentación o fluorescencia alguna, típicas de esta bacteria.

Así mismo fueron aisladas 11 cepas cuyas características morfológicas de la colonia son similares a una colonia típica de *B.thuringiensis*. Sin embargo, las estructuras que acompañaban a la spora al final de la esporulación no presentaron una forma bipiramidal bien definida<sup>1</sup>, por lo que se sugerirá más adelante realizar pruebas específicas para su confirmación.

Para la identificación del cristal ya fuera bipiramidal o amorfo se utilizó el colorante azul de Coomasie el cual lo tinte fácilmente diferenciándolo de la espora la cual no tinte, pero si delimita sus bordes, siendo rápida su identificación bajo un microscopio de luz, con un aumento de 1000X.

## 8.2 BUSQUEDA Y SELECCION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* QUE EJERZAN UN CONTROL EN LAS ESPECIES DE *Anastrepha ludens* Y *Anastrepha obliqua*.

Mediante los bioensayos fué posible evaluar el efecto de 14 cepas del material obtenido en el presente estudio. Asi también, fué adicionado un lote de 36 cepas de *B. thuringiensis* aisladas en suelo guatemalteco y 12 cepas provenientes del USDA propiedad del Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial, lo cual dió lugar a la evaluación de 52 cepas en cada una de las especies plaga en estudio.

De tales bioensayos preliminares, como se aprecia en el apéndice 5 en el que se detalla el resultado obtenido en cada cepa evaluada, sobresalió el efecto producido por 5 cepas en el control de la especie *A. ludens*, siendo estas: 4B, 7A, 18B, 15A, 200 y 7 cepas en la especie *A. obliqua*: 151, 15A, 5B, 4B, 7A, 15B, 190 como se puede apreciar en el cuadro 2. Realizandose posteriormente pruebas adicionales con el fin de seleccionar aquella o aquellas cepas que efectuaran mejor control.

---

1/ Es importante hacer notar, que si bien es cierto que la presencia del cristal en forma bipiramidal es característico del *B. thuringiensis* existen cepas del mismo que presentan cristales en forma piramidal, cuboide, amorfos e inclusive, aunque pocas, existen cepas que no producen cristal.

Cuadro 2. Resultados obtenidos por nueve diferentes cepas de *Bacillus thuringiensis* en el control de *Anastrepha* sp.

Cepa	<i>Anastrepha ludens</i> % de control	<i>Anastrepha obliqua</i> % control	Forma del cristal
4B	60	62	Amorfo
5B	-	57	Amorfo
7A	65	80	Amorfo
15A	66	30	Bipiramidal
15B	-	30	Bipiramidal
18B	43	-	Bipiramidal
151	-	33	Bipiramidal
190	-	30	Bipiramidal
200	44	-	Bipiramidal

Durante la evaluación se buscaba seleccionar las cepas que efectuaran control cercano al 70 % para ambas especies. A excepción de la cepa 7A, en la que se obtuvo control del 80 % en *A.obliqua* y 65 % en *A.ludens*, en las demás no se obtuvo mortalidad elevada para ambas especies, por lo que se seleccionó aquellas que presentaron los valores más elevados de control en cada una de las especies de *Anastrepha* bajo estudio, siendo cinco cepas para *A.ludens* ( con un mínimo de 43 % y un valor máximo de 66% ) y siete en el caso de *A.obliqua* ( cuyo rango osciló desde 30% hasta 80% ), dando lugar a evaluar nueve cepas diferentes.

A pesar que, en la preparación de las 52 cepas evaluadas no se

concentraron las tóxicas solubles en agua ( es decir no se sometieron a una ultrafiltración para eliminar el agua, sales y minerales ) por ser un ensayo de selección o preliminar, se alcanzaron valores altos de mortalidad, como se aprecia en las figuras 5 y 6, por parte de unas cepas en *A. ludens* y otras en *A. obliqua*. Debe considerarse que en los ensayos preliminares fueron evaluadas tanto las pro-toxinas como las toxinas juntamente; situación que se torna diferente en las pruebas finales en las que se separaron las fracciones tóxicas con el propósito de establecer cual de ellas ejercía el control.

Analizando los resultados obtenidos en cada cepa, se puede apreciar que el efecto del porcentaje de mortalidad observado en los ensayos preliminares no corresponde a la mortalidad causada por una fracción tóxica en particular, ya que se diluye o divide la mortalidad total obtenida entre las diferentes fracciones.

Sería conveniente determinar en estudios posteriores el modo de acción en función de efectos tales como aditividad, sinergismo, o bien antagonismo entre las fracciones tóxicas, ya que se presentaron algunos casos en los que, la suma del porcentaje de mortalidad de cada fracción por cepa evaluada en forma separada excede al porcentaje obtenido cuando estas fueron evaluadas juntamente, así como también se presentó el caso contrario, en el que, la suma del porcentaje de control tanto de la protoxina ( fracción insoluble ) como de las tóxicas ( fracción soluble ) fué menor al porcentaje de control obtenido al ser éstas evaluadas juntamente.

La figura 3 nos muestra el comportamiento de las cepas evaluadas en el control de *Anastrepha ludens* en el que si analizamos el porcentaje de mortalidad acumulada a lo largo de nueve días, tiempo de duración de la

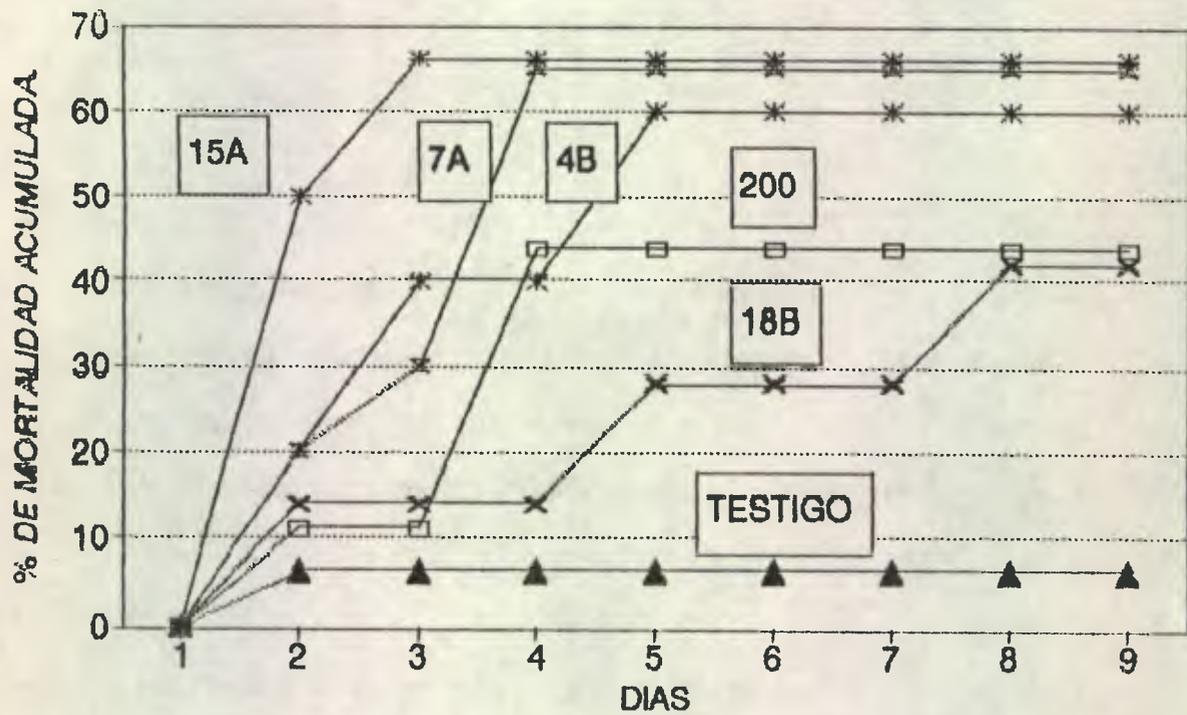


FIGURA 3: EFECTO PRODUCIDO POR 5 CEPAS DE *B. thuringiensis* EN *A. ludens*

prueba, encontramos que la mayor mortalidad se obtuvo entre el segundo y el quinto día principalmente, lo que coincide con los rangos de acción del *E.thuringiensis* citados en la literatura, permaneciendo posteriormente invariable la mortalidad en casi la totalidad de los casos hasta finalizar la prueba.

Efectuando el mismo análisis en la figura 4 encontramos un comportamiento similar en el efecto de las cepas analizadas, siendo en este caso la especie evaluada *A.ablucis*. A excepción de la cepa 7A en la que del cuarto al sexto día de evaluación presentó los valores más altos de mortalidad, las seis cepas restantes alcanzaron su mayor valor del segundo al quinto día de evaluación.

De manera general, se puede inferir que existió cierta homogeneidad en el tiempo de acción de las fracciones tóxicas evaluadas en el insecto huésped, las cuales actuaron en mejor forma del segundo al quinto día de evaluación.

No se observó para ninguna de las dos especies de mosca una sintomatología especial como: cambio de color, ablandamiento o presencia de mal olor.

En base a los resultados obtenidos del porcentaje de mortalidad de cinco cepas de *E.thuringiensis* seleccionadas para el control de la especie *Anastrepha ludens* como se aprecia en el cuadro 3, se llevó a cabo el análisis de varianza, cuadro 4, en que se encontraron diferencias estadísticamente significativas tanto entre el efecto de cada cepa, entre fracciones tóxicas como en la interacción entre cada cepa y sus fracciones tóxicas, dando lugar a una prueba múltiple de medias "Duncan".

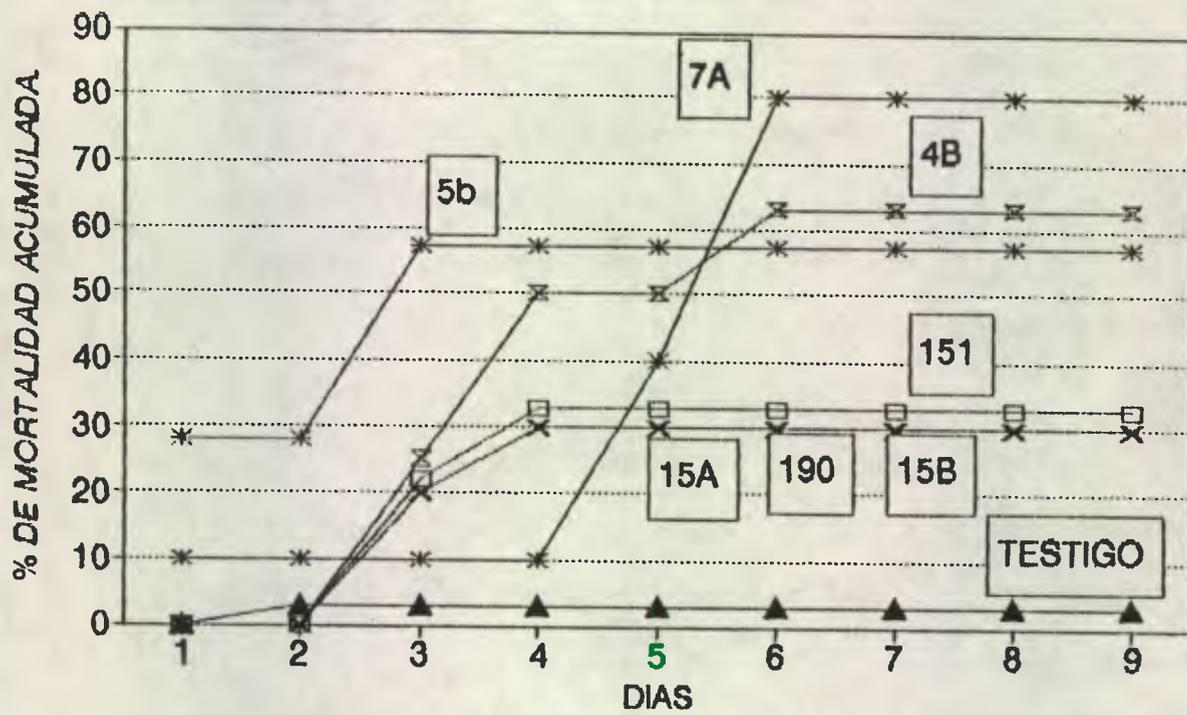


FIGURA 4: EFECTO PRODUCIDO POR 7 CEPAS DE *B. thuringiensis* EN *A. obliqua*

CUADRO 3. RESULTADOS DE LA MORTALIDAD PROMEDIO EJERCIDA POR 5  
CEPAS De *B.thuringiensis* EN EL CONTROL DE LA ESPECIE *A.  
ludens*.

cepa/fracción tóxica	A	B	C	D	TESTIGO
15A	14.60	7.38	16.87	13.59	7.05
18B	0.0	14.23	16.35	14.46	3.4
200	11.57	27.4	13.74	1.83	3.67
4B	9.49	22.0	7.33	16.28	0.0
7A	6.80	31.27	19.02	23.90	3.51

A = trat. 1, fracción tóxica soluble en agua.

B = trat. 2, fracción tóxica insoluble en agua.

C = trat. 3, tratamiento 1 / autoclave.

D = trat. 4, tratamiento 2 / autoclave.

Es importante hacer notar el efecto producido por las fracciones tóxicas (A) y (B) individualmente, las cuales contienen las toxinas y protoxina respectivamente, producidas por cada cepa, ya que tal efecto de mortalidad es menor al obtenido cuando estas son evaluadas en conjunto, tal como se observa en la figura 5.

Este fenómeno se generalizó en las 5 cepas evaluadas para el control de *A. ludens*, demostrando que tales fracciones tóxicas al ser proporcionadas juntamente desencadenan un efecto insecticida mayor, llegando a ser considerable tal incremento, como en el caso de las cepas 7A y 15A, las cuales alcanzaron valores hasta del 65 % y 66 % de mortalidad respectivamente.

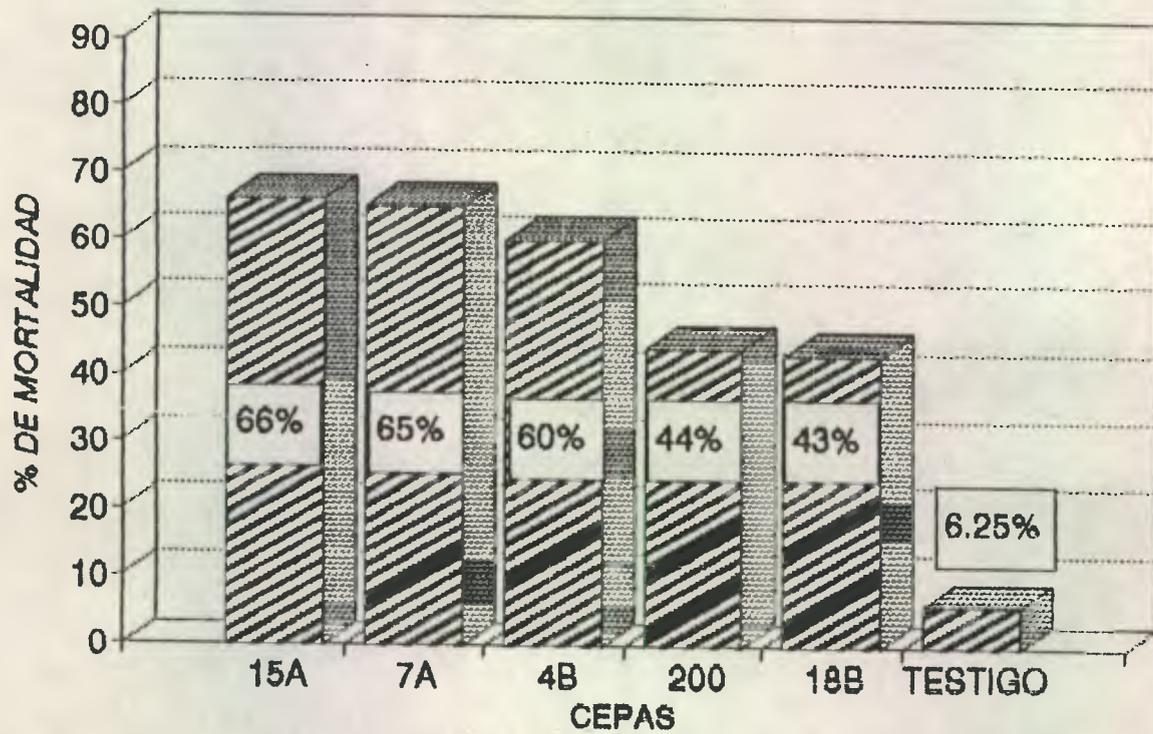


FIGURA 5: % MORTALIDAD PRODUCIDA POR 5 CEPAS DE *B. thuringiensis* EN *A. ludens*

## CUADRO 4. ANALISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN

*A. ludens*

Fuente de variación FV	grados de libertad GI	suma de cuadrados	cuadrado medio	valor "F" signifi- cancia
CEPA	4	9.9461	2.4865	10.74 0.0001
TRATAMIENTO	3	19.6158	6.5386	28.23 0.0001
CEPA*TRATA.	12	45.3747	3.7812	16.33 0.0001
ERROR	40	9.2635	0.2315	-----
TOTAL	59	84.2003		

La figura 5 nos muestra en las cepas 15A, 4B, y 7A los porcentajes de mortalidad más elevados, para el control de la especie *A. ludens*. Sin embargo al ser evaluadas las fracciones tóxicas por separado, tal efecto fué diluido de tal manera que, para la cepa 15A como se aprecia en el cuadro 3 el mayor efecto fué reportado en la fracción soluble en agua (A), y en la fracción A pasada por el autoclave (C), lo cual representa una limitante, ya que tales fracciones contienen las  $\beta$ -exotoxinas, cuyos efectos entre otros se le atribuye el aumento de aberraciones en el cromosoma de células de sangre humana, siendo la causa principal de su rechazo como insecticida en norteamérica y europa.

Ahora bien, el hecho de que en las cepas 7A, 200 y 4B el mayor efecto insecticida fuera encontrado en la fracción tóxica insoluble en agua (B) hace que adquieran estas una mayor importancia, ya que actualmente las endotoxinas son utilizadas para la formulación de insecticidas a base de *Bacillus thuringiensis*, que se venden comercialmente a nivel mundial, ya que no se ha demostrado que provoque efectos nocivos en el hombre.

En base a lo anterior podemos comprender mejor la relevancia de los resultados causados por la cepa 7A, presentados en la figura 7, la cual nos muestra los porcentajes de mortalidad por las distintas fracciones tóxicas de dicha cepa en el control de *A. ludens*. Siendo la fracción tóxica insoluble en agua ( B ) quien en promedio reportó el valor más alto de todas la fracciones obtenidas de las 5 cepas evaluadas (31.27 %), y la cual resultó superior a las demás como se aprecia en el apéndice 6 .

Es importante de igual manera considerar el potencial que presentan las cepas 4B y 7A para su utilización en programas de mejoramiento genético, tales como en la hibridación de cepas mediante la utilización de plásmidos ( ya que se ha demostrado que en éstos se codifica la producción de la endotoxina dentro de la bacteria ) de las cepas seleccionadas en el presente estudio, con el propósito de obtener cepas más eficaces en el control de las *Anastrepha sp.*

Al igual que en el análisis realizado para la especie *A. ludens* en el cuadro 5 se presentan los resultados promedio de las tres repeticiones realizadas con las 7 cepas de para el control de *A. obliqua*.

Los resultados presentados en el cuadro 5 nos muestran diferentes modalidades de acción por parte de las fracciones tóxicas de siete cepas ya que seis de ellas nos confirman el aumento del efecto insecticida cuando las fracciones son evaluadas juntamente, así como también se presenta el caso contrario para la cepa 190, que al adicionar el efecto de las fracciones A y B se sobrepasa el 30 % de mortalidad obtenido al evaluarse las fracciones en conjunto ( ver figura 6 ).

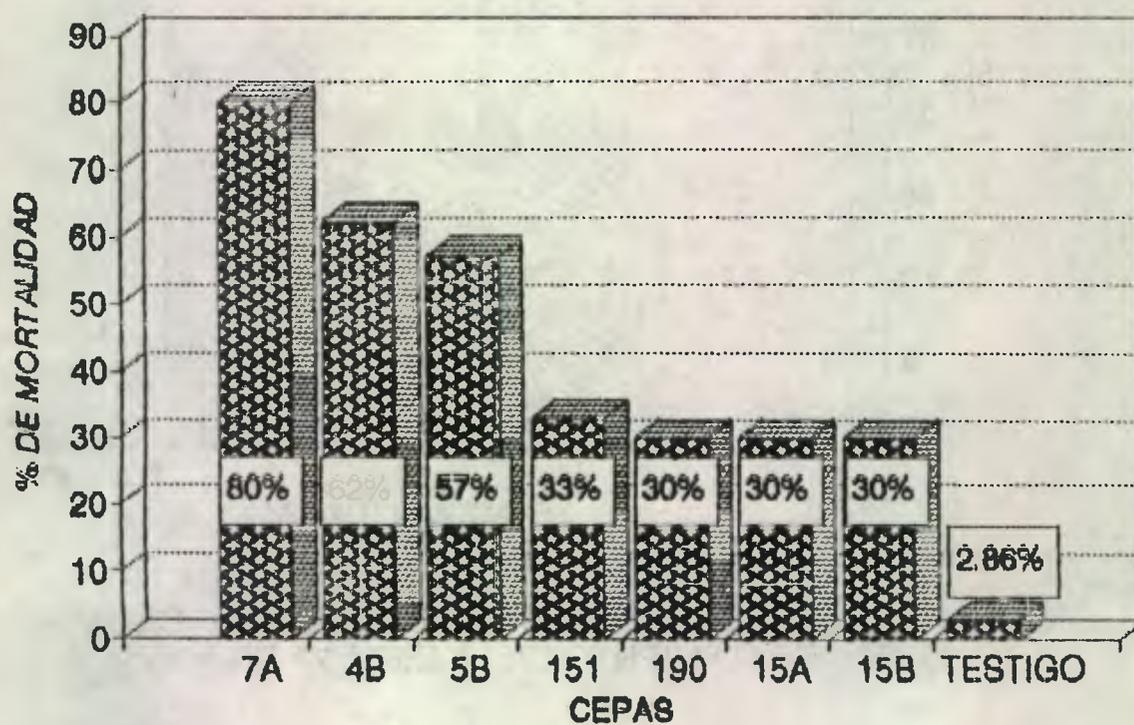


FIGURA 6: % MORTALIDAD PRODUCIDA POR 7 CEPAS DE *B. thuringiensis* EN *A. obliqua*

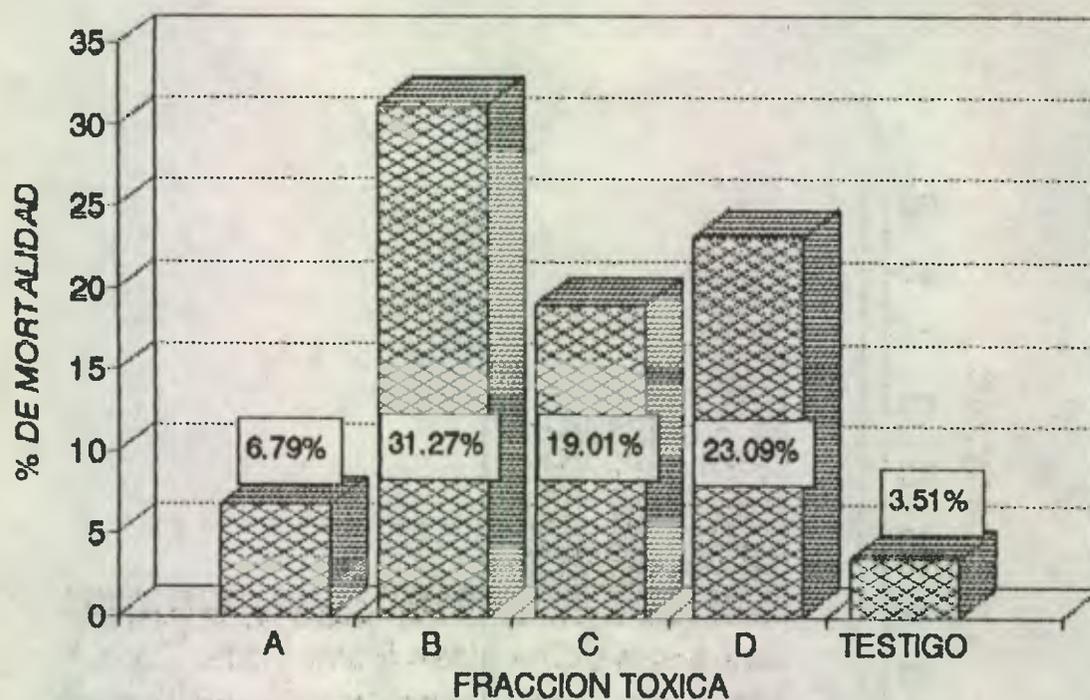


FIGURA 7: % DE MORTALIDAD POR CADA TRATAMIENTO EN LA CEPA 7A EN A. ludens

A = TRAT. 1, FRACC. TOXICA SOLUBLE EN AGUA

B = TRAT. 2, FRACC. TOXICA INSOLUBLE EN AGUA

C = TRAT. 3, TRATAMIENTO 1 / AUTOCLAVE

D = TRAT. 4, TRATAMIENTO 2 / AUTOCLAVE

CUADRO 5. RESULTADOS DE LA MORTALIDAD PROMEDIO DE 7 CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA CONTROLAR LA ESPECIE *A. obliqua*.

cepa/fraccion tóxica	A	B	C	D	TESTIGO
151	8.7	17.66	13.1	13.2	3.63
15A	12.03	13.03	11.4	0.0	7.67
15B	9.53	19.23	20.23	14.43	7.42
190	26.56	17.88	5.15	10.44	5.09
4B	16.18	25.78	1.85	5.19	7.08
5B	27.54	23.09	14.45	22.65	5.78
7A	20.13	6.31	13.94	67.45	8.42

Sin embargo, a pesar de existir un incremento en la mortalidad al ser evaluadas las fracciones juntamente es importante analizar las fracciones que realizaron el mejor control, debido a las consecuencias y limitaciones de uso que se presentan para algunas toxinas.

En cuanto a las posibilidades de uso comercial como insecticida biológico contra *A. obliqua* las cepas 4B, 5B y 7A ofrecen el mayor potencial ya que presentaron valores altos de control en las fracciones B y D como lo muestra el cuadro 5.

Analizando los distintos resultados obtenido por cada una de las siete cepas evaluadas fué necesario realizar un análisis de varianza, en el cual se reportaron en el cuadro 6 diferencias estadísticas para los resultados obtenidos entre cepas, tratamientos y la interacción de ambos, dando lugar a una prueba múltiple de medias "Duncan".

CUADRO 6. ANALISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE MORTALIDAD EN *A. obliqua*

FUENTE DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMA DE CUADRADOS	CUADRADO MEDIO	VALOR "F"	SIGNIFICANCIA
CEPA	6	42.4827	7.0804	26.59	0.0001
TRATAMIENTO	3	9.2809	3.0936	11.62	0.0001
CEPA * TRAT.	18	103.6229	5.7568	21.62	0.0001
ERROR	56	14.9090	0.2662	----	
TOTAL	83	170.2957			

Al igual que en *A. ludens* en *A. obliqua* la cepa 7A reportó los valores más altos de control, llegando en este caso a un valor promedio de 67.45 % en la fracción D como se aprecia de mejor forma en la figura 8 y el apéndice 7.

Tales resultados sitúan a las cepas 7A y 4B como alternativas altamente promisorias a evaluar en los programas de supresión de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua* a gran escala, tanto por los valores de control logrados como también por el tipo de fracción tóxica que presentó el mayor efecto insecticida. ( ver apéndice 7 )

Un detalle interesante lo constituye, las cepas 7A y 4B, ya que se aislaron de muestras de suelo provenientes de huertos frutales donde se reportaron poblaciones altas de la especie en estudio, a pesar de que varios autores no relacionan la presencia de *Bacillus thuringiensis* con el insecto plaga en un lugar determinado.

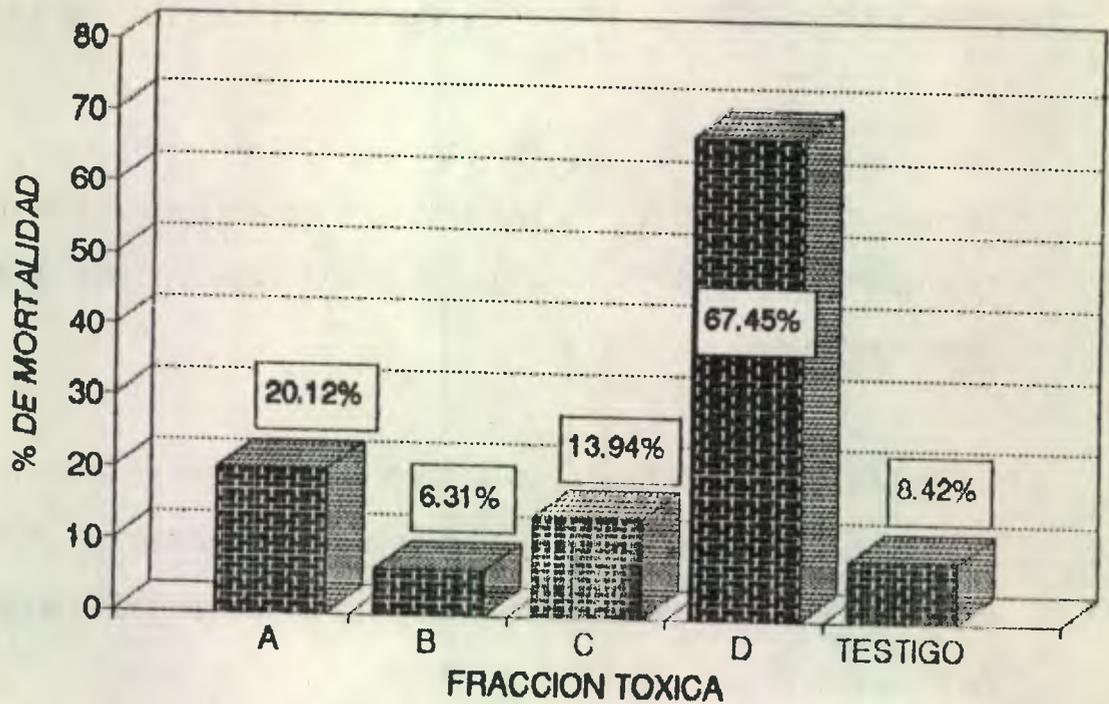


FIGURA 8: % DE MORTALIDAD POR CADA TRATAMIENTO EN LA CEPA 7A EN A. obliqua

A = TRAT. 1, FRACC. TOXICA SOLUBLE EN AGUA

B = TRAT. 2, FRACC. TOXICA INSOLUBLE EN AGUA

C = TRAT. 3, TRATAMIENTO 1 / AUTOCLAVE

D = TRAT. 4, TRATAMIENTO 2 / AUTOCLAVE

## 9. CONCLUSIONES

De acuerdo a los planteamientos iniciales se puede concluir lo siguiente:

- 1.- Existen cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas de suelo guatemalteco que ejercen control sobre las especies de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.
- 2.- Las cepas de *Bacillus thuringiensis* durante el proceso de fermentación producen diferentes fracciones tóxicas, que a la vez ejercen un efecto independiente, contribuyendo cada una con un determinado porcentaje en el control de las especies bajo estudio.
- 3.- La cepa número 7A, aislada en el departamento de Escuintla, región sur, ejerció el mejor control en *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua* alcanzando valores alrededor del 65 % y 80 % respectivamente al ser evaluadas todas las fracciones tóxicas juntamente.
- 4.- El tratamiento que realizó el mejor control en ambas especies, lo constituyó la fracción tóxica insoluble en agua (cristales parasporales) esto pone en relieve el potencial de esta cepa para ser usada comercialmente como insecticida
- 5.- El efecto de mortalidad causado por las diferentes fracciones tóxicas en conjunto de cada cepa es considerablemente mayor al efecto producido por éstas al ser evaluadas en forma individual.

## 10. Recomendaciones

- 1.- Llevar a cabo ensayos con jaulas de campo, como fase inicial, utilizando aquellas cepas de *Bacillus thuringiensis* que fueron seleccionadas por su efectividad en el control de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*, evaluando el efecto de todas las fracciones tóxicas de cada cepa en conjunto, previa eliminación de agua, sales y minerales, mediante el proceso de ultracentrifugación, a fin de establecer sus posibilidades y potencial para producirse comercialmente y promover su uso en programas de control a gran escala.
- 2.- Realizar estudios serológicos con aquellas cepas aisladas en el presente estudio a fin de determinar su clasificación taxonómica.
- 3.- Realizar estudios orientados a determinar el modo y lugar de acción de las diferentes fracciones tóxicas del *B. thuringiensis* especialmente en aquellas cepas efectivas en el control de *Anastrepha ludens* y *Anastrepha obliqua*.
- 4.- Analizar el comportamiento en cuanto a disminución o ausencia de fertilidad y retraso en el desarrollo de aquellos insectos que sobrevivieron a los tratamientos evaluados, especialmente en las generaciones posteriores.
- 5.- Determinar la dosis letal media de las cepas 7A y 4B por haber sido la más efectiva para ambas especies evaluadas en el presente estudio.
- 6.- Evaluar con distintas especies del género *Anastrepha* la toxicidad de cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas por su efectividad durante este ensayo.

- 7.- Evaluar la combinación de las diferentes cepas que reportaron el mejor control para determinar la posibilidad de un efecto aditivo en la supresión de las moscas.
- 8.- Evaluar el conjunto de cepas de *Bacillus thuringiensis* aisladas en Guatemala para comprobar el efecto insecticida que tendría en otras plagas que causan daño a la agricultura en Guatemala y con ello determinar otros campos de aplicación
- 9.- Considerar la posibilidad de incluir las cepas 4B y 7A en estudios de mejoramiento genético con el fin de obtener cepas más eficaces en el control de Dípteros especialmente del género *Anastrepha sp.*

## 11. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ALDUF, J.; RAYNAUD, M. 1970. Isolation and purification of bacterial toxic protein. // Microbial toxins. Ed. por Montie, T.; Kadis, S.; Aji, S. New York, Academic Press. v.I, p.128-134
- 2.- ALUJA, M. 1984. Manejo integrado de moscas de la fruta. México, Dirección General de Sanidad Vegetal. 241 p.
- 3.- BACH, P. DE. 1981. Control biológico de las plantas, insectos y malas hierbas. México, Continental. 949 p.
- 4.- BARTON, K.; WHITELEY, H.; YANG, N. 1987. *Bacillus thuringiensis*  $\delta$ -endotoxin expressed in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiology 65:1103-1109.
- 5.- BATEMAN, M. 1972. The ecology of fruit flies. Rev of Entomology (EEUU.) 17:493-516.
- 6.- BUCKMAN, H.; BRADY, N. 1977. Naturaleza y propiedades de los suelos. Trad. por R. Salord Barceló. España, Tonsa-San Sebastián. 590p.
- 7.- COVARRUBIAS, M. *et al* 1984. Dinámica poblacional de las moscas de la fruta del género *Anastrepha*. In Congreso de Manejo Integrado de Plagas ( 2., 1984, Guatemala, Gua. ). Memorias. Guatemala, Asociación Guatemalteca de Manejo Integrado de Plagas. p.406-415.
- 8.- CHAUTHANI, A. 1971. Comparison of commercially produced *Bacillus thuringiensis* var *thuringiensis* with two bioassay techniques based on toxicity units. Journal of Economic Entomology (EE.UU.) 64 (5):1,291-1,293.
- 9.- CHEUNG, P.; HAMMOCK, B. 1985. Separation of three biologically distinct activities from the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. Current Microbiology 12:121-126.
- 10.- CHILCOTT, C.; KALMAKOFF J.; PILLAI, J. 1984. Neurotoxic and haemolytic activity of a protein isolates from *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystals. Microbiology Letters 25:259 - 263.

- 11.- FAUST, R. *et al.* 1971. Standardization of the delta endotoxin produced by several varieties of *Bacillus thuringiensis*; 1. enzyme kinetics of the trypsin- azoalbumin - delta endotoxin system. *Journal of Economic Entomology* (EE.UU.)64(3):610-615
- 12.- \_\_\_\_\_ 1971. Standardization of the delta-endotoxin produced by several varieties of *Bacillus thuringiensis*; 2. enzyme inhibition (LN<sub>50</sub>) as a method of standardizing commercial preparation the delta endotoxin. *Journal of Economic Entomology* (EE.UU.) 64 (3):615-620.
- 13.-FAUST, R. 1988. Genetics and molecular biology of *Bacillus thuringiensis*: present and future strategies for improvement. *In* Coordination Workshop on Bacterial Control of Agriculture Insect pest and Vector of Human Diseases. (1988, En Gedy, Israel). En Gedy, Israel, Ben-Gurion University of the Negev. p. 5.
- 14.-FISHER, R. 1963. Biossay of microbial pesticides. *In* Analitical methods for pesticides, plant growth, regulators, and food additives. Ed. por Zweig, G. New York, EE.UU, Academic Press. p. 425-441.
- 15.-FISK, F. 1960. Feeding and drinking methods. *In* Methods of testing chemicals on insects. Ed. por Separd, H. *et al.* United States of America, Burgress. p.119-129.
- 16.- FREEMAN, B. 1984. Tratado de microbiología de Burrows. Trad. por Roberto Espinoza. 21 ed. México, Interamericana. 119 p.
- 17.-GINGRICH, R. 1971. Suceptibility if inmature horn flies to toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Journal of Economic Entomology*. (EE.UU.) 64 (5):1183-1187.
- 18.- \_\_\_\_\_ 1990. *Bacillus thuringiensis*. Austria, Entomology Unit, Joint FAO/IAEA programme. (Correspondencia personal)
- 19.-IGNOFFO, C. *et al.* 1970. Use of an agar-base diet and house fly larvae to assay  $\beta$  - exotoxin activity of *Bacillus thuringiensis* *Journal of Economic Entomology* (EE.UU.) 63 (6) :1987 - 1988
- 20.- JOHNSON, D.; PETERSON, R. 1983. Limitation of HPLC for the detection of  $\beta$ -exotoxin in culture filtrates of *Bacillus thuringiensis*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 17 : 231-234.

- 21.-LECADET, M. 1970. *Bacillus thuringiensis* toxins, the proteinaceous crystal. *In* Microbial toxins; bacterial protein toxins. Ed. por Montie, T.; Kades, S.; Aji, S. New York, Academic Press. v.3, p. 437-471
- 22.- LERECLUS, D.; *et al.* 1989. Role, structure and molecular organization of the genes coding for the parasporal  $\delta$  - endotoxin of *Bacillus thuringiensis*. *In* Regulation of Procarvotic Development. Ed. por Issar, S.; Slepdey, R.; Setlow, P. Washington, D.C., American Society of Microbiology. p 255-276.
- 23.-LUCCA, A. DE; SIMONSON, J.; LARSON, D. 1981. *Bacillus thuringiensis* distribution in soil of the United States. *Can J. microbiology* 27 : 865-870.
- 24.-LUTHY, P. 1990. History, taxonomy and use of *Bacillus thuringiensis* as an insecticide. *In* International Course on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis*. (1., 1990, Guatemala, Gua.). Guatemala, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. p1- 5.
- 25.-MARGALIT, J. 1988. The present status of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*. *In* Coordination Workshop on Bacterial Control of Agricultural Insect Pest and the Vector of Human Diseases (1988, En Gedi, Israel). En Gedy, Israel, Ben-Gurion University of the Negev. p.1.
- 26.-MARTIN, P.; TRAVERS, R. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. *Applied and Enviromental Microbiology*. 55(10):2437-2442.
- 27.-METCALF, C.; FLINT, M. 1987. Insectos destructivos e insectos útiles, sus costumbres y su control. 4 ed. México, CECSA. 1208 p.
- 28.- MEXICO. SECRETARIA DE AGRICULTURA Y RECURSOS HIDRAULICOS DPTO DE ENTOMOLOGIA. 1978. Guía para la identificación de moscas de la fruta. México. 40 p.
- 29.-RDWE, G.; MARGARITIS, A. 1987. Bioprocess developments in the production of bioinsecticides by *Bacillus thuringiensis*. *Critical Reviews in Biotechnology* 6(1) : 87-127.

- 30.-SANDLER, N.; ZOMPER, R.; MARGALIT, J. 1985. *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* crystal hemolysis as a possible basis for an assay of larval toxicity. Applied Microbiology and Biotechnology 23 : 47-53.
- 31.-SCHESSER, J. *et al* 1977. Biossay for homogeneous parasporal crystal *Bacillus thuringiensis* using the tobacco hornworm *Manduca sexta*. Applied and Enviromental Microbiology 33(4):878-880.
- 32.-STAUDER, N. 1990. Aislamiento de cepas de *B. thuringiensis* propias de Guatemala y caracterización de la endotoxina. Tesis Lic. Bioquímica. Guatemala, Universidad Del Valle, Facultad de Ciencias y Humanidades. 70p
- 33.- WHITELEY, H.;SCHNEPF, E. 1986. The molecular biology of parasporal crystal body formation in *Bacillus thuringiensis*. Annual Reviews in Microbiology 40 : 549 - 576.
- 34.-XOCONOSTLE, B. 1990. Transferencia de genes de *B.t.* a plantas. In International Course on the Biotechnology of *Bacillus thuringiensis* ( 1,1990 Guatemala, Gua. ). Guatemala, Instituto Centroamericano de Investigación y Tecnología Industrial. p. 6

va. B.a.  
*Petrucci*



## 12. APENDICES

APENDICE 1. PRODUCCION DE SUSTANCIAS INSECTICIDAS POR VARIETADES DE *Bacillus thuringiensis*.

Serotipo H <sup>1</sup>	variedad	$\alpha$ Exotoxina	$\beta$ Exotoxina	$\gamma$ Exotoxina	$\delta$ Endotoxina	Exotoxina labil	toxina soluble en agua	Exotoxina "mouse" factor
1	thuringiensis	+	+		+	+		+
2	finitimus	+	-		+			
3a	alesti	+	-		+		+	+
3a,3b	kurstaki	+	-		+			
4a,4b	sotto	+	-		+			
4a,4b	dendrolimus	+	-		+			
4a,4c	kenyae	+	-		+			
5a,5b	galleriae	-	+		+			+
5a,5c	canadensis	-	+		+			
6	subtoxicus	-	-	+	+			
6	entomocidus	-	-	+	+			
7	aizawai	+	+		+			
8a,8b	morrisoni	-	+		+			
8a,8c	ostrinae	+	-		+			
9	tolworthi	+	+		+			
10	darmstadiensis	-	+					
11a,11b	toumanoffi	+	+					
11a,11c	kyushuensis	+	-					
12	thompsoni	+	-					
13	pakistani	+	-					
14	israelensis	+	-		+			
15	dakota	+						
16	indiana	+						
-	wuhanensis <sup>2</sup>	-	-					
17	tohokuensis	-						
18	kumamotoensis	+	±					
19	tochigiensis	+	-					
20a,20b	gunnanensis							
20a,20b	pondicheriensis							
21	colmeri				+			
22	shandogiensis							
-	tenebrionis							
-	SanDiego							

<sup>1</sup> / basado en la clasificación, acorde al antígeno flagelar H de Barjac, instituto Pasteur, Paris

<sup>2</sup> / No poseen antígeno flagelar

+, positivo; -, negativo; en blanco, no determinado.

APENDICE 2. Detalle de cada lugar de muestreo.

Número de muestra	Departamento	región	toma de	Lugar de recolección muestra
1	Santa Rosa	sur	0 - 20 cms	huerto frutal
4	Santa Rosa ( Chiquimulilla )	sur	0 - 20 cms	plantación de mango
2	Sacatepéquez	sur	0 - 20 cms	huerto frutal
14	Sacatepéquez ( Antigua )	sur	0 - 20 cms	Plantación de naranja
3	Chimaltenango	sur		Silos de almacenamiento.
15,17,18 y 19	Chimaltenango ( San Martín Jilotepeque )	sur		Plaza central del mercado
20	Chimaltenango	sur	0 - 20 cms	campo sin cultivo
5	Escuintla ( Guanagazapa )	sur	0 - 20 cms	Plantación de mango 1
6	Escuintla ( Guanagazapa )	sur	0 - 20 cms	Plantación de mango 2
7	Escuintla ( La Democracia )	sur	0 - 20 cms	Plantación de mango
8, 9, y 10	Alta Verapaz ( Cobán )	norte	0 - 20 cms	vivero de frutales.
23	Alta Verapaz ( San José La Colina )	norte	0 - 20 cms	Plant. de naranja y limón
16 y 21	Zacapa	oriente	0 - 20 cms	Plantación de mango
22	Retalhuleu ( San Rafael, Mulúa )	Sur-occidente	0 - 20 cms	Plant. de Naranja y limón
24	Baja Verapaz ( San Jerónimo )	centro	0 - 20 cms	plantación de naranja y mandarina. 1
13	Baja Verapaz	centro	0 - 20 cms	plantación de naranja y mandarina. 2
11 y 12	Baja Verapaz	centro	0 - 20 cms	huertos frutales
25	Guatemala	centro		mercado la terminal, alrededor de fruta almacenada.

APENDICE 3. Procedencia de 26 cepas aisladas en Guatemala en 1990, utilizando el medio basal por Nina Stauder (28).

identificación de la cepa	lugar de aislamiento
164	Guatemala, silos de INDECA
165	Guatemala, mercado de la terminal
166	Guatemala, mercado de la terminal
167	Guatemala, mercado de la terminal
168	Guatemala, mercado de la terminal
169	Guatemala, mercado de la terminal
170	Guatemala, Avenida Bolivar.
171	Guatemala, mercado de la terminal
172	Guatemala, silos de INDECA
173	Guatemala, silos de INDECA
174	Guatemala, silos de INDECA
175	Guatemala, sacos de maíz.
179	Guatemala, mercado de la terminal
182	Chimaltenango, Patzicia
185	Chimaltenango, Patzicia
186	Zacapa, finca El Oasis.
187	Zacapa
188	Zacapa, finca El Oasis.
193	Guatemala, mercado de la terminal
196	Zacapa, granos de maíz
197	Chimaltenango, Patzicia
198	Chimaltenango, Patzicia
199	Chimaltenango, Patzicia
200	Chimaltenango, Patzicia
202	Los Encuentros

APENDICE 4. Doce cepas propiedad del Instituto Centro-Americano de  
Investigación y tecnología Industrial (ICAITI ).

Identificación de la cepa	variedad
149	berliner
150	finitimus
151	alesti
152	sotto
153	galleriae
154	aizawai
155	morrisoni
156	tolworthii
157	kurstaki (1)
158	kurstaki (2)
159	entomocidus
160	israelensis

APENDICE 5. Resultado obtenido en las pruebas de selección de 52 cepas de *Bacillus thuringiensis*.

Número de cepa	<i>Anastrepha ludens</i> % de mortalidad	<i>Anastrepha obliqua</i> % de mortalidad
149	0	14
150	20	0
151	14	33
152	0	12
153	20	0
154	10	0
155	9	0
156	0	25
157	17	15
158	0	10
159	0	10
160	17	0
164	0	11
165	10	22
166	0	0
167	12	10
168	19	20
169	0	20
170	0	12
171	10	0
172	0	0
173	0	0
174	23	0
175	0	5
179	0	0
182	0	28
185	0	28
186	10	20
187	0	23
188	0	0
190	0	30
193	8	0

Número de cepa	<i>Anastrepha ludens</i> % de mortalidad	<i>Anastrepha obliqua</i> % de mortalidad
196	0	0
197	0	0
198	0	12
199	0	26
200	44	29
202	0	0
1A <sup>1</sup>	0	0
2B	20	20
3A	33	0
4B	60	62
4C	0	29
5B	0	57
7A	65	80
15A	66	30
15B	0	30
18B	43	18
19A	10	10
23B	10	15
23C	0	23
24B	0	0

<sup>1/</sup> El número nos indica el lugar de recolección de la muestra ( ver apéndice 2), y la letra la submuestra de la cual se aisló la colonia.

APENDICE 6. PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS "DUNCAN" PARA LA INTERACCION  
ENTRE 5 CEPAS Y SUS FRACCIONES TOXICAS DE *Bacillus*  
*thuringiensis* EN EL CONTROL DE *A. ludens*.

CEPA	MEDIA	DUNCAN AL 5%
7a B	31.26	A
200 B	27.4	A B
7a D	23.9	A B C
4b B	22.0	B C D
7a C	19.02	B C D E
15a C	16.67	C D E
18b C	16.35	C D E
4b D	16.28	C D E
15a A	14.6	D E F
18b D	14.46	D E F
18b B	14.23	D E F
200 C	13.73	D E F
15a D	13.59	D E F
200 A	11.57	E F G
4b A	9.48	F G
15a B	7.38	G
4b C	7.33	G
7a A	6.80	G
200 D	1.80	H
18b A	0.0	I

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

APENDICE 7. PRUEBA MULTIPLE DE MEDIAS "DUNCAN" PARA LA INTERACCION  
 ENTRE 7 CEPAS Y SUS FRACCIONES TOXICAS DEL *Bacillus*  
*thuringiensis* PARA EL CONTROL DE *Anastrepha obliqua*.

CEPA	MEDIA	DUNCAN AL 5 %
7a D	67.45	A
5b A	27.54	B
190 A	26.56	B
4b B	25.78	B
5b B	23.09	B C
5b D	22.65	B C
15b C	20.23	B C D
7a A	20.13	B C D
15b D	19.23	B C D E
190 B	17.88	C D E F
151 B	17.66	C D E F
4b A	16.18	C D E F
5b C	14.45	D E F G
15b D	14.43	D E F G
7a C	13.94	D E F G
151 D	13.2	D E F G
151 C	13.1	E F G
15a B	13.03	F G
15a A	12.03	F G
15a C	11.4	F G
190 D	10.44	G H
15b A	9.53	G H I

---

CEPA	MEDIA	DUNCAN AL 5%
151 A	8.7	G H I
7a B	6.31	H I
4b D	5.19	I
190 C	5.15	I
4b C	1.85	J
15a D	0.0	K

---

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes





UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGRONOMICAS

LA TESIS TITULADA: BUSQUEDA, AISLAMIENTO Y SELECCION DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* NATIVAS EN GUATEMALA, PARA EL CONTROL DE LAS ESPECIES DE *Anastrepha ludens* Y *Anastrepha obliqua*.

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: JULIO FRANCISCO PENADOS BETANCOURT

CARNET NO: 8614965

Ha sido evaluada por los profesionales: Ingenieros Agrónomos José Miguel Leiva y Salvador Sánchez.

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Marco Tulio Aceituno  
ASESOR

Ing. Agr. Franz Hentze  
ASESOR

Dr. Luis Mejía de León  
DIRECTOR DEL IIA  
DIRECCION

IMPRESA:

Ing. Agr. Efraín Medina

DECANO



/sler.