

Metódo rápido y confiable para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)

.....

A rapid and reliable method for the evaluation of *Bacillus thuringiensis* native strains against *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera : Gelechiidae)

.....

Olga Yanet Pérez¹
Alejandro Rodríguez¹
Alba Marina Cotes²

Resumen

Tecia solanivora (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae), la polilla guatemalteca de la papa, es una plaga de reciente aparición en el país que hasta el momento ha causado grandes pérdidas en este cultivo. Su control con insecticidas químicos ha sido ineficiente; por tal razón el control biológico aparece como una alternativa promisoría. Con el fin de desarrollar una metodología de bioensayos para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra esta plaga, se desarrolló una dieta artificial consistente en puré de papa, agar, antioxidantes y preservantes, la cual fue estable en el tiempo, garantizó el mantenimiento de la larva y no afectó a la bacteria. Los bioensayos se llevaron a cabo en recipientes que contenían la dieta bajo las siguientes condiciones de laboratorio: temperatura 20°C, humedad relativa del 75% y fotoperiodo de 12 horas-luz.

Las cepas de referencia utilizadas fueron la HD-1 y la HD-137 y las cepas nativas fueron Bt-40, Bt-119, Bt-285, Bt-536 y Bt-538. Estas cepas contenían los genes Cry IA(b), IB y IC, reportados como activos contra *Phthorimaea operculella*, otro lepidóptero,

plaga de la papa. Para el bioensayo con cepas de referencia se utilizaron dos concentraciones de la bacteria medidas como proteína total (150 y 200 µg/ml) a partir de una suspensión de la bacteria obtenida de un cultivo crecido durante 15 días a 28°C y que presentaba microscópicamente abundante esporulación y producción de cristales. Las dietas se inocularon con las concentraciones mencionadas y se colocó un espécimen de primer instar larval por vaso, para un total de veinte larvas por tratamiento y tres réplicas de cada tratamiento. Se registró la mortalidad de las larvas cada 24 horas durante 120 horas. La cepa HD-1 produjo en comparación con la cepa HD-137 mayor mortalidad en las larvas, ésta fue del 96% en 96 h. Para la evaluación inicial de las cepas nativas se utilizó una concentración única de 100 µg/ml, teniendo como control positivo la cepa HD-1. Entre las cepas nativas, se seleccionó la Bt-40 por ser la que mayor actividad insecticida presentó (72% de mortalidad al cabo de 120 horas). Posteriormente, se realizaron bioensayos utilizando suspensiones de la bacteria que correspondían a 50,75,100,125 y 150 µg/ml de proteína total, bajo las condiciones mencionadas anteriormente. Mediante el análisis estadístico de PROBIT, se determinó una concentración letal media (Cl₅₀) de 56.9 µg/ml para la cepa de referencia HD-1 y de 95.45 µg/ml para la cepa nativa Bt-40. Este trabajo permitió estandarizar un método sencillo, rápido y eficaz para evaluar la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora*.

Palabras claves: *Bacillus thuringiensis*, *Tecia solanivora*, Polilla Guatemalteca, Control biológico, Bioensayos, Dieta artificial.

Summary

Tecia solanivora (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae)- Potato tuber moth (Polilla guatemalteca)-, is a new pest in Colombia, that causes big losses to the crop. Because commercial insecticides have not provided consistent control, biological control using entomopathogenic microorganisms appear as a promissory alternative. An efficient method for the evaluation of native strains of *Bacillus thuringiensis* as biological control of *T. solanivora* was developed. An artificial diet consisting on mashed potatoes, agar, antioxidants and preservatives was standardized. This diet was time stable, was consumed by the larvae and did not affect the bacteria. Bioassays were performed using the artificial diet under laboratory conditions of 20°C temperature, 75% relative humidity and 12 hours photoperiod. Reference and natives strains used were selected according to molecular characterization. These strains presented cry genes IA(b), IB and IC which codified for d-endotoxines with insecticidal activity against *Phthorimaea operculella*, a related lepidopteran potato pest. In order to select a reference strain to be used in bioassays, reference strains HD-1 and HD-137 were used at two concentration levels measured as total protein (150 and 200 µg/ml) of a bacterial suspension, obtained from a culture grown in L agar medium, during 15 days and 28°C, and presenting a big quantity of spores and crystals which was determined by microscopic analysis. The diet was inoculated with the mentioned concentrations and was infested with a first instar larva of *T. solanivora*. Larvae mortality was registered every 24 hours during 120 hours. The highest mortality percentage was obtained with reference strain HD-1, that showed 92% larvae mortality at 96 hours. Native strains Bt-40, Bt-119, Bt-285, Bt-536 and Bt-538, and reference strain HD-1 as positive control were evaluated for insecticidal activity as unique concentration of 100 µg of total protein/ml. Among all native strains, Bt-40 was selected because demonstrated the highest insecticide activity with 72% larvae mortality at 120 hours. Other bioassays using bacterial suspensions corresponding to 50, 75, 100, 125, 150 µg of total protein/ml were performed, under the mentioned conditions in order to determine lethal concentrations.

Statistical analysis PROBIT, showed a lethal concentration 50 (LC₅₀) for reference strain of 56.9 µg/ml and 95.45 µg/ml for Bt-40 native strain. This work allowed the standardization of a rapid, easy and reliable method for the evaluation of insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* against *Tecia solanivora*.

Key words : *Bacillus thuringiensis*, *Tecia solanivora*, Polilla guatemalteca moth, Biological control, Bioassays. Artificial diet.

¹ Químicos Farmacéuticos, Universidad Nacional de Colombia. Laboratorio de Control Biológico. CORPOICA. C.I. Tibaitatá

² Ph.D Fitopatología. Directora del Laboratorio de Control Biológico. Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas. CORPOICA. Tibaitatá. A.A. 240142. Santafé de Bogotá, D.C.

Introducción

Tecia solanivora es una plaga originaria de Centroamérica que fue traída a Suramérica en una importación de semilla contaminada hecha por Venezuela desde Costa Rica en 1983. La polilla se extendió en la zona del Táchira (área papera venezolana), luego por la acción del comercio masivo del producto llegó a Colombia en 1985, siendo registrada por primera vez en el municipio de Chitaga (Norte de Santander) (Benavides y Pardo 1995).

En la actualidad los daños ocasionados por esta plaga representan un problema grave en las zonas pperas de los departamentos de Santander y Norte de Santander, dado que ha llegado a causar pérdidas en campo y almacenaje que superan el 50%. Por su alto grado de adaptación, continuidad geográfica e intercambio vial intra e interdepartamental, *T. solanivora* ha alcanzado a infestar la zona papera del altiplano cundiboyacense, en donde se cultivan 120.000 ha. En esta zona el insecto apareció hacia el año 1993 en el municipio de Ventaquemada (Boyacá).

La polilla guatemalteca también ha sido registrada en las zonas productoras del departamento de Antioquia, las cuales están distribuidas en el oriente y el norte del departamento e incluyen 30.000 productores que cultivan un área aproximada de 14.000 ha. El perjuicio ocasionado por este insecto se ha incrementado notablemente en el último año llegando a causar daño al 100% de la semilla almacenada o de los tubérculos sembrados (Botero *et al.* 1995).

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria del suelo, que ha demostrado su eficiencia en el control de diversas plagas agrícolas. Esta bacteria es grampositiva y en su fase de esporulación produce inclusiones proteicas con actividad insecticida y alta especificidad contra insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera y Coleoptera (Feitelson *et al.* 1992).

Dado que hasta el momento no se dispone de métodos efectivos para el control de esta plaga y que su control biológico aparece como una opción promisoriosa, el objetivo del presente trabajo fue el de desarrollar una metodología que permitiera seleccionar cepas nativas de *B. thuringiensis* eficientes para el control de la plaga.

Materiales y Métodos

Todos los ensayos biológicos se realizaron en los laboratorios del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas (M.I.P.) CORPOICA Centro de Investigaciones Tibaitatá, situado en el Km 14 vía a Mosquera, Cundinamarca, con una altura aproximada de 2.640 m.s.n.m.

Cría del insecto

La población inicial del insecto, utilizada para los bioensayos, provino de la cría en dieta natural establecida en la sección de Entomología del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas. Esta población fue originaria de Motavita (Boyacá) y se obtuvo a partir de semillas de papa infestadas con el insecto. La renovación del pie de cría se hizo después de la segunda generación con pupas traídas del municipio de Rionegro, Antioquia, Regional No.4 de CORPOICA.

La cría fue mantenida en dieta natural, constituida por papas de la variedad capiro, en cubetas plásticas que contenían arena y eran cubiertas con muselina blanca siguiendo la metodología propuesta por Londoño (1995).

El cuarto de cría utilizado para *T. solanivora* tenía las siguientes condiciones ambientales controladas: temperatura promedio de 20°C ± 5°C, humedad relativa promedio de 70% ± 10% y un fotoperiodo de 12 horas luz.

Desarrollo de una dieta artificial para la realización de los bioensayos con *Tecia solanivora*

Teniendo en cuenta que la literatura no señala bioensayos en dieta artificial para *Tecia solanivora* se decidió desarrollar una dieta merídica para tal fin. Los aspectos que se tuvieron en cuenta para el desarrollo de dicha dieta fueron que presentara estabilidad, es decir que no sufriera deterioro por oxidación, degradación o contaminación durante el tiempo de observación del ensayo; que fuera aceptable por las larvas sin afectar su desarrollo normal, que presentara buena consistencia y que no afectara a la bacteria.

Se realizaron evaluaciones en el tiempo probando puré de papa solo y mezclado con ácido ascórbico, ácido sórbico, nistatina, metilparabeno y agar. Se evaluaron las posibles mezclas, obteniendo así una dieta óptima para la realización de los bioensayos.

Bioensayos

Las cepas nativas de Bt utilizadas en el presente trabajo hacen parte del banco de cepas de CORPOICA; fueron aisladas a partir de muestras de suelo de diferentes sitios del país. El aislamiento de estas cepas se hizo de acuerdo con Martin y Travers (1987). Posteriormente, las cepas fueron caracterizadas molecularmente por el Programa Nacional de Biotecnología Agrícola de CORPOICA para verificar la presencia de los genes Cry activos.

Las cepas de *Bacillus thuringiensis* utilizadas en los bioensayos fueron escogidas con base

en criterios como el tipo de genes Cry que poseían, su procedencia y la cantidad y tipo de cristal que producían.

Dado que hasta el momento no se han señalado genes Cry que codifiquen para proteínas específicas con actividad contra *T. solanivora*, se tomó como criterio para la selección de las cepas, que presentaran genes efectivos contra *Pthorimaea operculella* (Zeller), polilla del orden Lepidoptera que también ataca al cultivo de la papa. Los genes reportados con alta actividad contra esta plaga son: Cry IA(b), Cry IB y Cry IC (Escrive B. *et al.*, 1994). Las cepas así seleccionadas fueron las cepas de referencia HD-1 y HD-137 (Tabla 1) y cepas nativas: B.t. 40, B.t.-119, B.t 285, B.t.536 y B.t. 538 (Tabla 2).

Las concentraciones de la bacteria a utilizar en los bioensayos se obtuvieron de una suspensión concentrada proveniente de un cultivo crecido en Agar L durante 15 días, al que se le había confirmado previamente una alta producción de cristal. La suspensión de la bacteria se hizo en tampón de fosfatos (K₂HPO₄ 10mM [pH 7.4] + NaCl 0.15M). Las concentraciones se determinaron como cantidad de proteína total siguiendo el método de cuantificación de Bradford (1976), utilizando como patrón estándar una curva de calibración de albúmina sérica bovina.

Para la realización de los bioensayos con *Tecia solanivora* en dieta artificial se utilizó el método de aspersión de la bacteria sobre superficie siguiendo las normas diseñadas por Dulmage *et al.* (1971). Se utilizaron larvas de primer instar o neonatas, dejadas en cuarentena y que estuvieran en buen estado. Esta larvas además fueron mantenidas en ayuno 24 horas antes de la realización del ensayo para estimular su voracidad.

La dieta artificial desarrollada para la realización de los bioensayos con *Tecia solanivora* se dispuso en placas de poliestireno de 24 pozos. Cada pozo tenía una capacidad de 2 ml y 2 cm de diámetro y se llenó con cerca de 1.8 ml de la dieta.

Una vez solidificada la dieta, en la superficie de ésta se inocularon 100 µl de la concentración de *Bacillus thuringiensis* a probar, se dejó secar aproximadamente 1 hora en ambiente estéril bajo la cámara de flujo laminar y se procedió a colocar una larva de primer instar en cada uno de los pozos.

Las placas con las larvas se envolvieron con plástico autoadherible, practicando uno o dos orificios en la cubierta de cada pozo. Estas placas fueron tapadas con su respectiva tapa de poliestireno, la cual fue recubierta en su interior con una muselina negra tupida para evitar que las larvas pudieran escapar y para evitar igualmente la posible oxidación del puré

Tabla 1. Cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis* utilizadas para los bioensayos

CEPA	GENES cry*	PROCEDENCIA
HD-1 var. <i>kurstaki</i>	IA(a); IA(b); IA(c)	Instituto de Biotecnología U.N.A.M. (México)
HD-137 var. <i>aizaway</i>	IA(a); IB; IC; ID	Instituto Louis Pasteur París (Francia)

Tabla 2. Cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas para el bioensayo con *Tecia solanivora*

CEPA	GENES CRY	PROCEDENCIA
40	IA(b); IB; ID	Suelo Pandi (Cundinamarca)
119	IA(a); IB; IC	Suelo Palmira (Valle)
285	IA(a); IA(b); IA(c); IB; ID	Suelo Tabio (Cundinamarca)
536	IA(a); IA(b); IA(c); IB; ID	Suelo Tumaco (Nariño)
538	IA(a); IA(b); IA(c); IB	Suelo Tumaco (Nariño)

con la luz. Finalmente estas placas fueron sujetadas con bandas elásticas. Se hicieron monitoreos a las 24, 48, 72, 96 y 120 horas, realizando observaciones generales de comportamiento, morfología y conteos del número de larvas muertas con ayuda del estereoscopio. El experimento fue repetido tres veces en días diferentes y el modelo experimental utilizado fue de bloques completamente al azar.

Selección de una cepa de referencia

Con el fin de determinar la cepa de referencia con mayor actividad para este insecto y la concentración óptima de la bacteria a utilizar en la evaluación de las cepas nativas, se realizó un bioensayo preliminar; las cepas de referencia utilizadas fueron la HD-1 var. *kurstaki* y la HD-137 var. *aizaway*. De cada una de las cepas se probaron dos concentraciones, 150 y 200 µg de proteína total/ml de suspensión, también se tuvo en cuenta un testigo tratado con tampón de fosfatos (pH 7.4) y un testigo absoluto. Se determinó el número de larvas vivas y muertas, haciendo observaciones cualitativas sobre los cambios en la morfología y el comportamiento de las larvas. Las concentraciones de las cepas seleccionadas expresadas como µg de proteína total/ml fueron realizadas en tampón de fosfatos como se explicó anteriormente.

Evaluación preliminar de las cepas nativas

Con el fin de evaluar en forma preliminar la actividad insecticida de las cepas nativas seleccionadas, se utilizó una dosis única de 100 µg de proteína total/ml la cual fue estandarizada a partir del bioensayo anterior con las cepas de referencia. Las evaluaciones de mortalidad se hicieron cada 24 horas durante 96 horas.

Determinación de las concentraciones letales de las cepas nativa y de referencia de *Bacillus thuringiensis*

Para la realización de este bioensayo se probaron cinco concentraciones de la cepa HD-1 y de la cepa nativa que presentó la mayor actividad insecticida en el bioensayo anterior. Estas concentraciones fueron 50, 75, 100, 125 y 150 µg de proteína total/ml. La metodología seguida fue la misma utilizada para el desarrollo de los bioensayos anteriores.

Análisis estadístico de resultados

El número de larvas vivas en cada bioensayo se determinó mediante la fórmula de corrección de mortalidad de Abbott (Ciba-Geigy 1978).

Los resultados de mortalidad encontrados para los diferentes tratamientos fueron analizados mediante la prueba de comparación de promedios Duncan con un nivel α del 0.05%, y mediante un análisis de varianza. Para la determinación de los valores de las concentraciones letales se utilizó el análisis de regresión logarítmico Probit.

Resultados y Discusión

Desarrollo de dieta artificial para la realización de bioensayos con *Tecia solanivora*

Dado que *T. solanivora* es una plaga de la papa, se escogió este tubérculo como nutriente principal para la preparación de la dieta. Las papas liberadas de su cáscara se sometieron a cocción en agua y luego se maceraron hasta obtener un puré suave y de fácil ingestión para el insecto. Esta cocción disminuyó en gran parte la oxidación probablemente debido a la inactivación de las enzimas oxidativas del tubérculo; sin embargo, fue necesario agregar algunos agentes antioxidantes y preservantes para su conservación.

Cuando se utilizó el puré como dieta, éste se contaminó fácilmente con hongos y bacterias, por tal motivo, se evaluaron diferentes agentes preservantes tales como el metilparabeno, la nistatina y el ácido sórbico los cuales difirieron en la protección conferida a la dieta contra la contaminación.

Este ensayo fue realizado en recipientes plásticos translúcidos de 50 ml de capacidad cubiertos por una tela negra estéril para evitar la oxidación del puré por la luz, los agentes preservantes fueron incorporados en el agua de cocción de los tubérculos en el momento de licuarlos para hacer el puré.

Se hicieron observaciones periódicas durante 7 días aproximadamente, colocando 5 larvas de primer instar del insecto por recipiente para observar si se alimentaban de la dieta y si se veían afectados o no por la misma. Durante este tiempo se observó si las dietas se contaminaban o si sufrían procesos oxidativos y se determinó el nivel de supervivencia de las larvas, evaluando por triplicado cada uno de los ingredientes por separado y mezclados entre sí, con lo cual se demostró que los más adecuados fueron las mezclas ácido sórbico-metilparabeno y ácido ascórbico-ácido sórbico, en las cuales se presentó una sobrevivencia de las larvas superior al 90%. Las mezclas que contenían Nistatina no se tuvieron en cuenta puesto que este compuesto puede causar trastornos en el desarrollo normal de las larvas por ser considerado como un agente teratogénico. Se escogió la dieta preservada con ácido ascórbico y ácido sórbico por ser la que, a lo largo de los ensayos, mos-

tró un mejor comportamiento tanto frente a la larva como frente a la bacteria.

La concentración de ácido ascórbico escogida para estos ensayos fue baja (0.05%) ya que se ha encontrado que en altas concentraciones este agente antioxidante inhibe la alimentación en larvas neonatas, según lo señalado por Navon *et al.* en 1990. Se realizaron mediciones del pH de la dieta debido a que muchos de estos conservantes son inefectivos a pH neutros o alcalinos como es el caso del ácido sórbico. La composición final de la dieta estandarizada para la realización de los bioensayos con *Tecia solanivora* aparece en la Tabla 3.

Selección de una cepa de referencia

La cepa HD-1 presentó una mortalidad en las larvas de 98% después de 96 horas con la concentración de 200 µg/ml y de 91% con la concentración de 150 µg/ml. En este mismo tiempo la cepa HD-137 presentó un porcentaje de mortalidad de 96% con la concentración de 200 µg/ml y de 73% con la concentración de 150 µg/ml, siendo la mortalidad promedio en los testigos del 10%. Sin embargo, el análisis estadístico de Duncan, con un nivel α de significancia del 0.05%, no determinó diferencias significativas entre los tratamientos en los que se usaron concentraciones de proteína total de 200 µg/ml y 150 µg/ml de la cepa HD-1 y el tratamiento en el que se usó 200 µg/ml de la cepa HD-137, y se determinaron diferencias significativas entre estos últimos tratamientos y aquel en el que se usó una concentración de proteína de 150 µg/ml de la cepa HD-137 (Fig.1)

Este ensayo demostró que el comportamiento de ambas cepas de referencia es muy similar ; sin embargo, la cepa HD-1 presentó un mayor porcentaje de mortalidad en un menor lapso de tiempo, éste fue de 85% a las 72 horas con la concentración de 150 µg/ml, comparada con la cepa HD-137 que, con la concentración de 200 µg/ml en este mismo tiempo, causó un

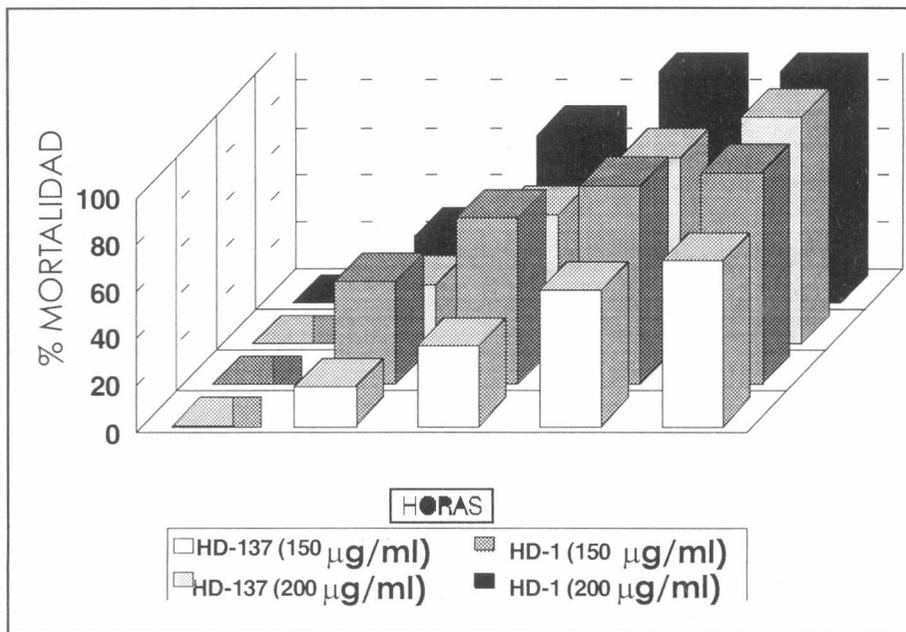


Figura 1. Actividad insecticida de dos cepas de referencia de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora*

79% de mortalidad, lo que sugeriría que HD-1 es la cepa más potente contra *T. solanivora*.

Debido a que los resultados de mortalidad obtenidos con las cepas de referencia sobrepasaron el 90%, se decidió disminuir la dosis a 100 µg/ml para los bioensayos que tenían el propósito de determinar la actividad insecticida de las cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* seleccionadas.

Evaluación preliminar de la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *T. solanivora*

De las cepas nativas evaluadas la que mostró mayor actividad insecticida contra *Tecia solanivora*, fue la cepa Bt-40 que produjo en las larvas una mortalidad del 72% a las 96 horas. Sin embargo, la actividad insecticida de

esta cepa no superó la producida por la cepa de referencia HD-1 que ocasionó una mortalidad del 96% en el mismo tiempo (23.5% más de mortalidad que Bt-40.). Los resultados de mortalidad con ambas cepas según el análisis estadístico Duncan no fueron significativamente diferentes (Fig. 2).

El análisis estadístico de Duncan mostró diferencias significativas en los promedios de mortalidad entre las cepas HD-1 y Bt-40 con respecto a las cepas Bt-538, Bt-285, Bt-536 y Bt-119 y que produjeron respectivamente una mortalidad del 62%, 60%, 51% y 36%.

Por otro lado, los efectos producidos por *Bacillus thuringiensis* sobre las larvas en lo referente a disminución de tamaño, movilidad y vigor, fueron similares para todas las cepas evaluadas. Las cepas que produjeron los menores porcentajes de mortalidad permitieron que las larvas sobrevivientes se desarrollaran casi normalmente, en tanto que el crecimiento de las larvas sobrevivientes a los tratamientos con las cepas más tóxicas estuvo restringido.

Estos resultados demostraron que *T. solanivora* es altamente susceptible a las toxinas codificadas por los genes Cry IA(a), IA(b), IA(c) que posee la cepa de referencia HD-1 y a las codificadas por los genes Cry IA(b), IB y ID que posee la cepa Bt-40. *T. solanivora* parece ser susceptible a las toxinas codificadas por estos tres genes y además a las toxinas codificadas por el gen Cry ID que está presente en las cepas Bt-40, Bt-285, Bt-536.

Tabla 3. Composición de la dieta para los bioensayos con *Tecia solanivora*.

INGREDIENTES	CANTIDADES (1 L DE DIETA)
Agar Bacteriológico	7.3 g
Agua Destilada estéril	345.5 ml
Papa variedad capiro	364.0 g
Solución de Acido Sórbico 0.1%+ Acido Ascórbico 0.05%	18.2 ml

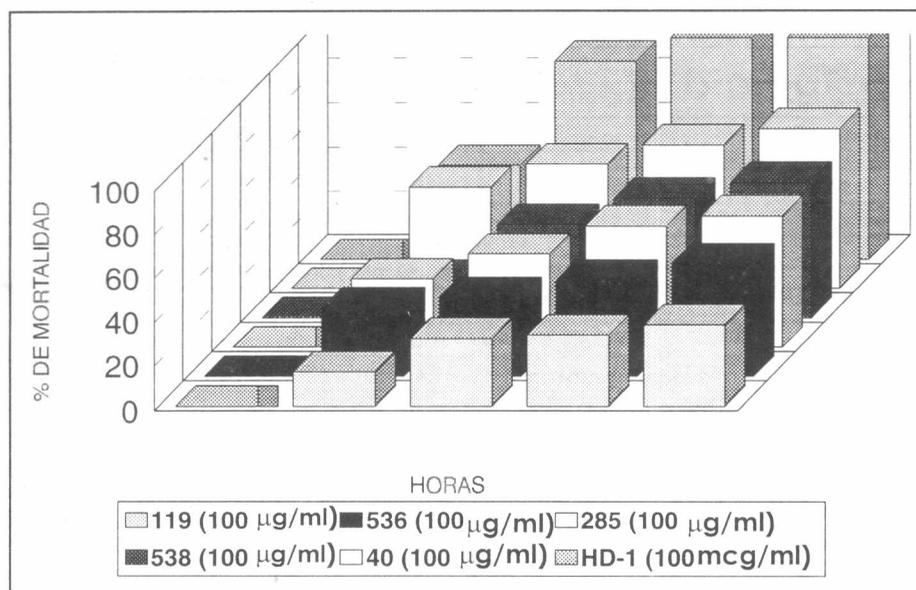


Figura 2. Evaluación de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Tecia solanivora*

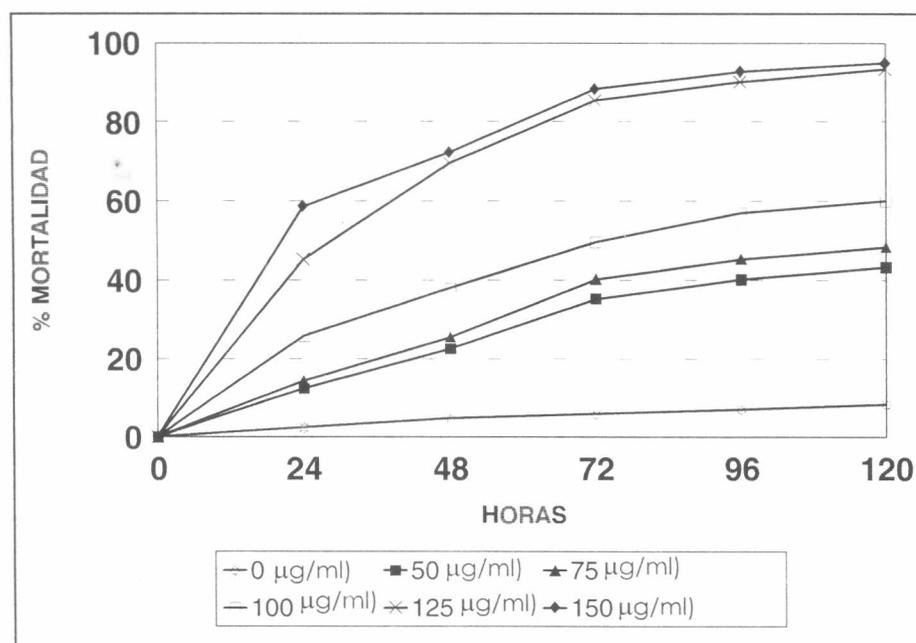


Figura 3. Evaluación de diferentes concentraciones de la cepa nativa Bt-40 sobre *Tecia solanivora*

Determinación de dosis letales para la cepa de referencia y la nativa de *Bacillus thuringiensis*

Teniendo en cuenta los resultados referentes a la actividad insecticida de las cepas HD-1 y Bt-40, se procedió a realizar la determinación de las concentraciones letales utilizando en cada ensayo 5 concentraciones de estas cepas:

50, 75, 100, 125 y 150 µg de proteína total/ml (Fig. 3).

Los resultados analizados mediante el análisis Probit, permitieron determinar las concentraciones letales 10, 50 y 90 tanto para la cepa de referencia HD-1 como para la cepa nativa Bt-40 (Tablas 4 y 5).

El valor de la concentración letal media obtenido para *T. solanivora* con la cepa Bt-40 fue de 95.52 µg de proteína total por ml y para la cepa de referencia HD-1 fue de 56.91 µg/ml. La actividad biológica encontrada sitúa a esta cepa nativa como promisoría para el control biológico de *T. solanivora* y confirma el buen comportamiento de la misma.

Observaciones cualitativas y pruebas de efectividad

Durante la realización de los bioensayos se hizo un seguimiento periódico de manera cualitativa con base en los cambios en la morfología y en el comportamiento de las larvas, para evaluar los cambios que éstas sufrieron en los diferentes tratamientos con la bacteria. A las pocas horas de iniciado el ensayo, se evidenció una reducción en el movimiento de las larvas. Dicha reducción fue progresiva hasta dejar las larvas completamente inmóviles y con total ausencia de estímulos externos (parálisis de la actividad motora). Esta respuesta podría ser efecto de la d-endotoxina que de manera indirecta afecta las células nerviosas del insecto. En algunos organismos susceptibles se ha observado que este efecto tóxico inicial puede ser tan rápido, del orden de minutos, que se ha sugerido que es producido por la protoxina intacta y no por la toxina activada (Aronson *et al.* 1986). A las 48 horas, se observó enanismo pronunciado de las larvas tratadas al compararlas con los testigos sanos ya que dejaron de alimentarse; estas larvas intoxicadas con la bacteria desarrollaron coloraciones grises o negruzcas en la parte media del abdomen que fueron visibles a través del cuerpo y correspondieron a lo indicado por Fast y Donaghue (1971), quienes después del tratamiento con *B. thuringiensis*, detectaron tejidos necrosados debido al incremento de la actividad secretora de las células del epitelio intestinal, daño mecánico, ruptura de las células epiteliales, deterioro de las células columnares y basales, posterior separación de éstas de las células, microvellos intestinales e invasión de los fluidos intestinales en la hemolinfa y flacidez corporal. Después de su muerte, estas larvas se convirtieron en cadáveres ennegrecidos con bacterias y esporas en su interior debido a la septicemia.

Durante los bioensayos se observó que las larvas sometidas a las dosis más altas de las cepas más tóxicas consumieron en menor cantidad la dieta que cuando fueron sometidas a las dosis más bajas. Las observaciones permitieron concluir que *B. thuringiensis* afecta las larvas de *T. solanivora* en las primeras horas después de su ingestión pero que su efecto letal se empieza a manifestar después de 24 horas.

Tabla 4. Análisis Probit para la cepa de referencia HD-1 con *Tecia solanivora*

HD-1	Límite Inferior µg/mL	Valor µg/mL	Límite superior µg/mL
CL ₁₀	15.36	31.45	52.98
CL ₅₀	26.01	56.91	85.25
CL ₉₀	98.65	121.03	141.36

* Concentración letal determinada para la estimación de toxicidad con un límite de confianza de 95%.

Tabla 5. Análisis Probit para la cepa nativa B t -40 con *Tecia solanivora*

Bt -40	Límite Inferior µg/ml	Valor µg/ml	Límite Superior µg/ml
CL ₁₀	20.74	43.44	58.74
CL ₅₀	63.28	95.52	125.3
CL ₉₀	132.39	168.28	240.86

* Concentración letal determinada para la estimación de toxicidad con un límite de confianza de 95%.

Conclusiones

- La dieta artificial estandarizada para *Tecia solanivora* permitió la realización de los bioensayos en forma rápida y confiable.
- Se estandarizó una metodología de bioensayos adecuada para la evaluación de cepas nativas de *B. thuringiensis* contra *T. solanivora*.
- El estudio realizado demostró que las larvas de primer instar de *T. solanivora* son susceptibles a las toxinas producidas por las cepas de referencia y nativas de *Bacillus thuringiensis* evaluadas.

- La cepa nativa Bt-40 fue la más promisoría por su elevada actividad insecticida para el control biológico de larvas de *T. solanivora*.
- La cepa de referencia HD-1 var. *kurstaki* fue seleccionada por su alta actividad insecticida como control positivo para la realización de los bioensayos con *T. solanivora*.

Bibliografía

ARONSON, A. ; BECKMAN, A. ; DUNN, P. 1986. *Bacillus thuringiensis* and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50 (1) : 1-24.

- BENAVIDES, M. ; PARDO, F. 1995. Manejo integrado de la polilla guatemalteca de la papa. ICA. Santafé de Bogotá.
- BOTERO, M. ; LONDOÑO, M. ; TRILLOS, O. 1995. Detección de la polilla de la papa. ICA-CORPOICA, Medellín.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem 72: 248-254.
- CIBA-GEIGY. 1978. Manual de ensayos de campo. Boletín como realizar un bioensayo. Bogotá. : 14-18
- DULMAGE, H. ; BOENING, O. ; REHNBORG, C. ; HANSEN, G. 1971. A proposed standardized bioassay for formulations of *Bacillus thuringiensis* based on the international units. J. Invertebr. Pathol. 13 (2): 240-245.
- FAST, D.G. ; DONAGHUE, T. P. 1971. The delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*: II On the mode of action. J. Invertebr. Path. 16 : 135-138.
- FEITELSON, J. ; PAYNE, J. ; KIM, L. 1992. *Bacillus thuringiensis*, Insects and Beyond. BioTechnol. 10 : 271-275.
- FINNEY, D. 1971. Probit Analysis. A statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press. London. : 70-79.
- LONDOÑO, M. 1995. Cría de *Tecia solanivora* Povolny para ensayos biológicos. CORPOICA. Rionegro, (Antioquia).
- MARTIN, P.A. ; TRAVERS, R. S. 1989. Worldwide abundance and distribution of *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl. Environ. Microbiol. 55 (10) : 2437-2442.
- NAVON, A. ; KLEIN, M. ; BRAUN, S. 1990. *Bacillus thuringiensis* potency bioassays against *Heliothis armigera*, *Earias insulana*, and *Spodoptera littoralis* larvae based on standardized diets. J. Invertebr. Pathol. 55 : 387-393.