



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ACTIVIDAD INSECTICIDA DE BACTERIAS ASOCIADAS AL
CULTIVO DE CHILE (*Capsicum annuum* L.) Y AISLADAS DEL
Anthonomus eugeni Cano COMO ALTERNATIVA DE
CONTROL BIOLÓGICO EN ESTA PLAGA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biotecnología)

Presenta

Perla Yunuen Escobar Martínez

La Paz, Baja California Sur, Agosto de 2008

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Director de Tesis

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S.

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S.

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Co-tutor

Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, La Paz, B.C.S.

COMITÉ REVISOR

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

MIEMBROS DEL JURADO DEL EXAMEN DE TESIS

Dr. Felipe de Jesús Ascencio Valle

Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes

Dr. Ramón Jaime Holguín Peña

Suplente:

Dr. Ángel Isidro Campa Córdova

RESUMEN

Anthonomus eugenii Cano, comúnmente conocido como picudo o barrenillo del chile, es una de las plagas más importantes del género *Capsicum* tanto en México como en otras partes del mundo. La hembra realiza la oviposición en el fruto por lo que se alimenta de este durante todos sus estadios, lo cual le hace ser una plaga peligrosa ya que se puede perder desde el 50 al 100% de la cosecha. En virtud de ello, se ha planteado la posibilidad de evaluar la actividad insecticida de bacterias aisladas del picudo y de bacterias asociadas al cultivo del chile, en este modelo entomológico.

A partir de muestreos en campo de frutos sanos e infestados con *A. eugenii*, se determinó el perfil de las comunidades bacterianas asociadas al cultivo de chiles y en el propio insecto mediante la técnica de SSCP; así mismo, se realizó el aislamiento de bacterias por métodos tradicionales de microbiología para la evaluación de su capacidad insecticida. Se hicieron colectas de insectos en los estadios adultos y larvas; se establecieron condiciones controladas para su mantenimiento así como su reproducción y se evaluó la variación ontogénica de las enzimas hidrolíticas por API ZYM System sentando bases para el conocimiento de su fisiología.

La estructura de la comunidad bacteriana asociada al cultivo de chile verde se vio modificada de acuerdo a la localidad y con respecto a frutos no infestados con el insecto, en *A. eugenii* el perfil bacteriano es dependiente del lugar de colecta y las familias dominantes fueron Enterobacteriaceae y Bacillaceae. Se logró mantener y reproducir los insectos en todos sus estadios en el laboratorio en un rango de temperatura entre 22 y 25°C sin fotoperiodo. Se presentaron diferencias significativas en la actividad enzimática en la ontogenia del insecto, mostrándose valores más altos en el estadio L1. Se encontró que *Bacillus cereus* tiene capacidad insecticida con un 92 % de mortalidad en *A. eugenii* y las bacterias *Enterococcus faecium* y *Bacillus* sp. fueron patógenos al insecto modificando la consistencia de sus heces.

Palabras Clave: Picudo de Chile, Actividad Insecticida, Diversidad Bacteriana.

ABSTRACT

Pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano is the major pest of papperes (*Capsicum spp*) in Mexico and other countries. Females oviposit inside the fruit, and it serves as feed during all their instars. It represents a problem since it is possible to lose a complete crop.

Therefore it has been proposed to evaluate insecticidal activity of microorganisms in this biological model. From infested and not infested fruits sampled from different localities, the microbial community profile associated to fruit and insects was determined by SSCP. In order to evaluate the insecticidal activity, cultivable bacteria from both fruits and insects were isolated using traditional methods. *A. eugenii* insects at adult or larvae stadium were colleted, and their maintenance and reproduction conditions were established. In order to study the physiology of *A. eugenii*, the ontogenic variation of hidrolytic enzymes were evaluated by the API ZYM system.

Differences in the microbial community profiles between infested and not infested fruits were observed. Moreover, the same differences were observed in fruits that were sampled from different localities. Finally in *A. eugenii*, the microbial community profiles were independent of the localities where them were sampled.

Enterobacteriaceae and Bacillaceae were the dominant bacterial groups in both fruits and insects.

It was possible to maintain *A. eugenii* in all instars at temperatures ranged between 22 to 25 °C without photoperiod. The enzymatic activity showed significative differences during the various larval stadiums of *A. eugenii* showing the highest activity at the L1 instar. Moreover, a strain of *Bacillus cereus* showed insecticidal activity against *A. eugenni* with 92% of mortality. Finally, two strains of *Enterococcus faecium* and *Bacillus sp.* were pathogens for *A. eugenii* causing modifications in the appearance of their feces.

Keyword: Pepper weevil, insecticidal activity, microbial community.

*¿Qué es lo que fue?
Lo mismo que será.
¿Que es lo que ha sido hecho?
Lo mismo que se hará,
pues nada hay nuevo debajo del sol.*

Eclesiastés 1:9

In memorium

Arturo Escobar un padre maravilloso, excelente amigo pero sobre todo un gran maestro. Siempre disfrutaste vivir la vida porque la considerabas un regalo. No olvido tu alegría reflejada en una gran sonrisa, tus múltiples consejos, tu capacidad de mediar cualquier situación. Te extraño tanto Papá, pero quiero decirte que termine uno de mis sueños a lado de mi proyecto más grande Perla Isabella.

Con todo mi corazón

Todo esto te lo debo a ti. Porque de ti depende mi vida y no podría continuar sin tu amor y cuidados “Dios Gracias”.

Mama en tu honor porque me diste tu vida ayer, hoy y siempre.

Hermanos Arturo, Celia y Jafet los quiero y admiro, mi vida no tendría el mismo sentido sin cada uno de ustedes.

Mi niña tuyo es mi corazón tu compañía en la etapa final de este trabajo fue un gran aliento. Gracias por existir eres mi tesoro “perlita”.

Emmanuel como recompensar el regalo que me diste.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada No. de Registro 200963 y al Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste No. Expediente 1000610030. Gracias a sus respectivos apoyos estas instituciones me permitieron cursar de manera exitosa mis estudios de posgrado, nivel maestría.

Agradezco de una manera muy especial a mi Comité Tutorial, al Dr. Felipe Ascencio Valle quien no solo fungió su papel de Director de Tesis sino que creyó en mi ofreciéndome su apoyo para realizar este sueño que estuve apunto de abandonar. A la Dra. Thelma Rosa Castellanos Cervantes que siempre mostró un gran interés brindando apoyo para la realización de mi trabajo además de sus consejos acertados y finalmente al Dr. Ramón Jaime Holguín Peña que ofreció comentarios oportunos para consolidar el trabajo de investigación.

Muchísimas personas en el CIB han brindado un apoyo invaluable para el desarrollo de este trabajo de investigación y quiero de una manera especial decirles que no tengo como recompensar toda su generosidad. Norma y Sofía (Diagnostico Microbiológico); Ariel (Microscopia Electrónica); Norma y Orlando (Ecología Química); Minerva y Marte (Cepario); Ángel (Ecología Microbiana); Paty (Fisiología Comparada); Ing. Landa, Martín, Don Amado y Pedro (Campo Agrícola Experimental CIBNOR); Manuel (Biotoxinas Marinas); Arturo Sierra (Edificio A); Brenda (Programa PAZA); Adriana y Aldo (Diseño) Horacio y Manuel (Centro Computo Posgrado); Diana Dorantes (Ingles); Betty, Osvelia, Claudia, Leticia, Lupita (Dirección de Posgrado); Dr. José Luis García Hernández, Dra. Rosalía Servín Villegas (Investigadores Programa PAZA).

Armando Tejas gracias por desempeñar de manera tan profesional su trabajo y enseñarme todo lo que usted sabe de insectos. Chula definitivamente tus consejos, regaños y demás sirvieron de algo. Delia y Nacho gracias por todos su apoyo en los problemas técnicos difíciles de resolver y por brindarme su amistad. Mario mil gracias por tus asesorías eres un buen maestro.

A toda la patobanda que sin ustedes definitivamente el trabajo seria monótono y sin sentido. Claudia y María Esther amigas incondicionales, Mau mi hija y yo estamos agradecidas contigo por tu ayuda. In Memorium Roberto hacen falta tus ideas y se te extraña.

Tatis tienes una sobrinita mexicana y nunca voy a poder pagarte todo lo que hiciste por nosotras.

Izmene mi hermana del alma, la vida no me alcanzaría para recompensar todo lo que has hecho por mí.

CONTENIDO.

INDICE DE FIGURAS	i
INDICE TABLAS	iv
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	5
2.1 Origen e importancia económica del genero <i>Capsicum</i>	6
2.2 Picudo de chile	6
2.2.1 <i>Distribución</i>	7
2.2.2 <i>Ubicación Taxonómica</i>	7
2.2.3 <i>Biología del insecto</i>	7
2.3 Métodos de control del picudo de chile	8
2.3.1 <i>Control químico y cultural</i>	9
2.3.2 <i>Control biológico</i>	9
2.4 Bacterias con potencial bioinsecticida	10
2.4.1 <i>Diversidad microbiana</i>	12
2.5 Bioensayos de actividad insecticida.	13
2.5.1 <i>Cría de insectos</i>	14
2.5.2 <i>Enzimas hidrolíticas</i>	14
III HIPOTESIS	16
IV. JUSTIFICACION	16
V. OBJETIVOS	17

5.1	Objetivo General	17
5.2	Objetivos Particulares	17
VI.	MATERIALES Y METODOS	18
6.1	Recolección de muestras	18
6.1.1	<i>Aislamiento de bacterias en campos agrícolas</i>	19
6.1.2	<i>Colecta de larvas y adultos de picudo de chile</i>	20
6.2	Determinación del perfil de poblaciones bacterianas por la técnica de conformaciones polimórficas de cadena sencilla (SSCP)	20
6.2.1	<i>Aislamiento de ADN bacteriano</i>	20
6.2.2	<i>Amplificación por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i>	23
6.2.3	<i>Purificación, digestión y desnaturalización de los productos de PCR</i>	24
6.2.4	<i>Electroforesis de geles de poliacrilamida</i>	24
6.2.5	<i>Secuenciación e identificación taxonómica</i>	25
6.2.6	<i>Árboles filogenéticos</i>	26
6.2.7	<i>Análisis de perfiles de SSCP</i>	26
6.3	Cría del insecto	27
6.3.1	<i>Mantenimiento y propagación</i>	27
6.3.2	<i>Análisis de la actividad enzimática en el <i>A. eugenii</i>.</i>	29
6.3.3	<i>Cuantificación de proteínas</i>	30
6.3.4	<i>Análisis estadístico</i>	30
6.4	Evaluación de actividad insecticida	30
VII.	RESULTADOS	32

7.1	Aislamiento de bacterias	32
7.2	Determinación del perfil de poblaciones bacterianas por la Técnica SSCP	33
7.3	Cría de insectos	54
<i>7.3.1</i>	<i>Mantenimiento y propagación</i>	55
<i>7.3-2</i>	<i>Análisis de actividad enzimática</i>	60
7.4	Evaluación de actividad insecticida	64
VIII.	DISCUSIONES	66
8.1	Aislamiento bacteriano	66
8.2	Diversidad microbiana	67
8.3	Cría de insectos	68
8.4	Enzimas hidrolíticas	70
8.5	Actividad insecticida	72
IX.	CONCLUSION	74
X.	REFERENCIAS	75

INDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Exposición controlada de la plaga picudo de chile en plantas de chile verde en la etapa fenológica de producción. El cultivo se desarrollo en un invernadero bioseguro, libre de pesticidas químicos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.	18
Figura 2.	a) Contenedores de frutos infestados para obtención masiva de picudos de chile adultos. b) Frasco de plástico para cría de los insectos en todos sus estadios en condiciones de laboratorio.	28
Figura 3.	Aislamientos bacterianos de fruto de chile y del <i>A. eugenni</i> adulto.	32
Figura 4.	Muestras de ADN genómico de las bacterias aisladas en caldo TSB y de los extractos de ADN bacteriano. MW (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE).	33
Figura 5.	Productos de PCR del 16S rADN a partir de ADN genómico bacteriano de aproximadamente 400 pb. MW (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE).	33
Figura 6.	Fotografía de MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de muestras de los extractos de ADN bacteriano y bacterias cultivadas obtenidas de la superficie del picudo de chile y del fruto de chile. a) Muestras del picudo de chile en el Carrizal (P1) y en Cd. Constitución (P2); b) Muestras de frutos de chile (CH2) colectadas en el Carrizal; c) Muestras de fruto de chile (CH3) Cd. Constitución; d) Muestras de extractos de ADN bacteriano de frutos de chile expuestos de forma controlada al picudo de chile y e) Muestras cultivo dependiente de frutos de chile expuestos de forma controlada al picudo de chile.	36
Figura 7.	Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones de un fragmento de 400 pb de la subunidad ribosomal 16S que muestra la relación filogenética de aislamientos bacterianos. a) Aislamientos de fruto de chile de campos agrícolas; b) Aislamientos de frutos de chile expuestos al insecto de forma controlada y c) Aislamientos a partir del insecto picudo de chile.	44

- Figura 8.** Localización de bandas (OTUs) analizadas a partir de la técnica SSCP utilizando el programa GelCompar II V 4.602. Los puntos indican la posición de las bandas identificadas. **47**
- Figura 9.** Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de bacterias aisladas en medio de cultivo de la superficie del picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles señalan primer muestreo (P1), segundo muestreo (P2), la letra M números seriales que indican a la muestra de bacterias cultivables. **48**
- Figura 10.** Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de extracto de ADN bacteriano y las bacterias aisladas en cultivo obtenidas de la superficie del picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles señalan primer muestreo (P1), segundo muestreo (P2), la letra M y S con números seriales que indican a la muestra cultivable y la de extracto de ADN respectivamente. **49**
- Figura 11.** Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras control obtenidas en la exposición controlada de frutos de Chile al picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control inicial (Ci) y control final (Cf) y números seriales que señalan a la muestra de extracto de ADN bacteriano. **50**
- Figura 12.** Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de fruto de Chile a las 48 h de exposición controlada al picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control inicial (Ci) y Ti (Tratamiento a 48 h) y números seriales que señalan a las muestras de extracto de ADN bacteriano. **51**
- Figura 13.** Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de fruto **52**

de chile después de las 48 h de exposición controlada al picudo de chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control final (Cf) y Tf (Tratamiento después 48 h) y números seriales que señalan a las muestra de extracto de ADN bacteriano.

- Figura 14.** Perfiles bacterianos de las muestras de fruto expuestos de manera controlada al picudo de chile agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican tratamiento a 48h (Ti) después 48h (Tf) y números seriales que señalan a las muestra de extracto de ADN bacteriano. **53**
- Figura 15.** Perfiles bacterianos de las muestras de fruto expuestos de manera controlada al picudo de chile y enriquecidas en caldo TSB agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control final (Cf) tratamiento a 48h (Ti) después 48h (Tf) y la letra M con números seriales que señalan a las muestras de bacterias aisladas en caldo de cultivo TSB. **54**
- Figura 16.** Distribución de los picudos de chile al momento de emerger de los chiles ovipositados en condiciones de laboratorio a una temperatura de 22-25 °C sin fotoperíodo. **56**
- Figura 17.** Ciclo de vida del *A. eugenii* Cano obtenido en condiciones de laboratorio. a) Huevecillos, b) Larva 1, c) Larva 2, d) Larva 3, e) Pupa y f) Adulto. **57**
- Figura 18** Análisis de la morfología del picudo de chile en sus diferentes estadios por microscopia electrónica de barrido **58**
- Figura 19.** Actividad enzimática hidrolítica total presente en los diferentes estadios del *A. eugenii*. 1) Huevecillo, 2) Larva 1, 3) Larva 2, 4) Larva 3, 5) Pupa, 6) Adulto. **62**
- Figura 20.** Actividad Enzimática en nM/mg proteína de las Enzimas Hidrolíticas presentes en los diferentes estadios del insecto (1. Huevecillo; 2. Larva 1; 3. Larva 2; 4. Larva3; 5. Pupa; 6. Adulto). a) Glucosidasas. b) Fosfatasas c) Proteasas y d) Lipasas. **63**

Figura 21.	Porcentaje de mortalidad de los aislamientos bacterianos obtenidos tanto del insecto como de frutos de Chile.	64
-------------------	---	-----------

INDICE DE TABLAS.

Tabla I.	Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de segmentos específicos de las regiones variables del gen ribosomal 16S (Tebbe <i>et al.</i> , 2001).	23
Tabla II.	Programa de PCR para la amplificación de regiones variables del gen 16S (Tebbe <i>et al.</i> , 2001).	23
Tabla III.	Enzimas con su respectivo sustrato detectadas en el Sistema API ZYM.	29
Tabla IV.	Identificación parcial de las Unidades Taxonómicas Operacionales obtenidas de muestras del insecto <i>A. eugenii</i> Cano y Frutos de Chile de diferentes localidades.	41
Tabla V.	Registro preliminar de la oviposición controlada de picudo de Chile en el laboratorio.	55
Tabla VI.	Actividad Enzimática utilizando el API ZYM (U sustrato hidrolizado en nM mg ⁻¹ de proteína) detectada en homogenizados de huevecillo, larva 1, larva 2, larva 3, pupa y adulto de <i>Anthonomus eugenii</i> Cano. Los valores mostrados son las medias (\pm DS) de 3 replicas.	61
Tabla VII.	Identificación parcial de las cepas bacterianas que mostraron efecto insecticida en <i>A. eugenii</i> Cano.	65

I. INTRODUCCION.

La agricultura actualmente exige no sólo una aplicación más eficaz de las tecnologías actuales en producción de cosechas, sino la adquisición y uso efectivo de los nuevos conocimientos.

Las plagas han sido un problema crónico en la agricultura desde sus inicios. A pesar de la aplicación de 2.5 millones de toneladas de plaguicidas en todo el mundo, más del 40% de todos los productos potenciales para alimento se pierden por causa de plagas y enfermedades antes de la cosecha (Gatehouse *et al.*, 1992; Paoletti y Pimentel, 2000).

Por más de 50 años la aplicación de productos químicos sintéticos ha sido la forma dominante en el control de plagas debido principalmente al desarrollo de la industria química y al los sistemas de agricultura intensiva y extensiva (Waage, 1993; Ghorbani *et al.*, 2008); estimándose que alrededor de 5 millones de toneladas de pesticidas son aplicados anualmente en el mundo, aumentando 10 veces el consumo desde 1950-2000 (Matson *et al.*, 1997; Ghorbani *et al.*, 2008).

SEMARNAP en 1999 define pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias que se destina a controlar cualquier plaga, incluidos los vectores de enfermedades humanas y de animales, así como las especies no deseadas que causen perjuicio o que interfieran con la producción agropecuaria y forestal.

Actualmente gran parte de los problemas que afronta la agricultura moderna en relación al control de plagas ha sido en su mayoría consecuencia directa de las acciones tomadas para mejorar las cosechas haciendo un mal manejo del agrosistema. Este problema se ha intensificado debido a los sistemas de agricultura intensiva y extensiva.

Al hacer un empleo desmedido de agroquímicos, el problema se refleja particularmente en insectos principalmente cuando se establece un sistema de monocultivo, ya que se ofrecen condiciones óptimas para el desarrollo y diseminación de poblaciones.

Otro problema es que la dependencia de insecticidas químicos ya sean solos o mezclados ha llevado a la selección y prevalencia de poblaciones de insectos tolerantes o resistentes. El empleo de dosis mas altas a las recomendadas para mantener las poblaciones por abajo del umbral económico ha traído como consecuencia problemas crónicos de salud, contaminación ambiental y una producción agrícola económicamente incoesteable ya sea por el alto costo de los insumos o debido a problemas relacionados con la inocuidad alimentaria.

El uso excesivo de agroquímicos, así como el inadecuado manejo y disposición de sus envases, ha sido un problema generalizado en México. Hasta 1992 se utilizaban 30 plaguicidas de los cancelados o restringidos en Estados Unidos y actualmente muchos plaguicidas empleados en nuestro país se han prohibido en otros países por su toxicidad y su uso aumenta a razón de 10% al año (INEGI, 1992; CICOPLAFEST, 2000; Juárez, 2004).

El interés por estudiar al Picudo de Chile y utilizarlo como modelo biológico está dado por el hecho de ser una plaga severa a los chiles picosos y dulces (*Capsicum spp*) y es la principal causa del uso de insecticidas químicos en el cultivo de Chile en el sur de Estados Unidos, México, Centro América, incluso Hawai y varias Islas del Caribe (García, 2001; Schuster, 2007). La pérdida de frutos puede ser del 30 al 90% de la cosecha si un tratamiento no es implementado (Elmore *et al.*, 1934; Velasco, 1969; Riley y Sparks, 1995). El desarrollo de la larva y su alimentación dentro del fruto reduce la producción en

la cosecha por lo que el manejo de la plaga es difícil y se requiere de conocimientos precisos de los tiempos de desarrollo del insecto y su umbral.

Actualmente estrategias de manejo integral de plagas son utilizadas porque en realidad, estas hacen acopio de diversas agrobiotecnologías de fácil manejo en campo como el biocontrol o biopesticidas (Matthew, 1999; Vázquez, 2005; Khan, 2008).

La mayoría de los microorganismos con actividad insecticida han sido aislados de ambientes terrestres o directamente del insecto plaga (Zhang, 1996; Leonard y Julios, 2000). Siendo los insecticidas bacterianos los principales componentes en la industria de los biopesticidas ya que de los más de 500 péptidos antimicrobianos descritos un número relativamente alto están patentados como biopesticidas (Xie, 1998; Shi, 2000; Hancock 2002; Selim *et al.*, 2007) aunque aún son pocos los de uso agrícola.

Para un desarrollo eficaz de los bioinsecticidas, se requieren de pruebas de laboratorio a través del desarrollo de bioensayos *in vitro* e *in vivo* con el fin de seleccionar microorganismos con posible actividad biológica contra algún insecto plaga en específico y para determinar los niveles de toxicidad en los organismo blanco, además de conocer el posible mecanismo de acción y su patogénesis (Krieg y Herbert, 1984; Montesinos, 2003).

Por lo que, el presente trabajo de investigación aborda la selección y caracterización de cepas bacterianas asociadas al fruto de chile (*C. annuum*) y en picudo de chile (*A. eugenii*) por técnicas microbiológicas y de biología molecular para conocer aquellas con potencial para el control del picudo de chile *A. eugenii*

El desarrollo y conocimiento de los parámetros biológicos, bioquímicos, fisiológicos y el ciclo de vida de *A. eugenii* caracterizados en el laboratorio permiten dirigir los estudios hacia la búsqueda e integración de otros métodos de control maximizando la

eficiencia del manejo de esta plaga Toapanta, *et al.* 2005 obtuvieron parámetros biológicos e información del ciclo de vida del picudo de chile en condiciones controladas con *C. annuum* o chile jalapeño, por lo que, se hace imprescindible su cultivo en el laboratorio permitiendo disponer de suficientes individuos en todas las fases de su desarrollo para su estudio, además de su disponibilidad para bioensayos en el laboratorio.

II. ANTECEDENTES.

Es bien sabido que la agricultura tradicional disturba los ecosistemas naturales e impone un sistema de manejo con consecuencias desfavorables (directas e indirectas) en el ambiente. Por ejemplo, se estima que el bromuro de metilo, el cual es usado como un fumigante de suelos en la agricultura, es el responsable del 5 a 10% del adelgazamiento de la capa de ozono, y repercute en problemas de salud humana (Allen *et al.*, 1995).

El combate de plagas, tradicionalmente ha incluido el concepto de matar al insecto, sin embargo actualmente se contempla en el control de plagas cualquier agente que evite el incremento en las poblaciones y el cual puede ser implementado por el hombre o puede ser de forma natural.

El picudo de chile es una plaga común e importante del chile, históricamente ha causado severas pérdidas y deterioro de la calidad del fruto; se ha dificultado su control por ser un barrenador que se alimenta dentro del tejido de la planta durante una parte o todos sus estados destructivos. Se abren paso a las plantas introduciendo el huevecillo en el tejido por medio del ovipositor de la hembra o abriéndose paso al interior al comer después de que nacen de los huevecillos. En cualquier caso el agujero por donde ellos se introducen, casi siempre es muy pequeño, con frecuencia invisible. Se han reportado infestaciones severas del 70-90% de flores y botones por el insecto y hasta el 100% de infestación en frutos de chile de cultivos comerciales (Seal *et al.*, 2002) por lo que se dificulta el control del insecto originando alrededor de 15 aplicaciones de insecticida por temporada en México (Servin *et al.*, 2007).

2.1 Origen e importancia económica del género *Capsicum*

Los antropólogos describen como Mesoamérica la parte central y sur de México y parte de América Central, las cuales han sido indicadas como el centro de origen y domesticación del género *Capsicum* (Vavilov, 1951; Conciella *et al.*, 1990).

México tiene la mayor variabilidad genética de *Capsicum annum* dando origen a gran número de variedades adaptadas a las diferentes condiciones agroecológicas del país; la superficie sembrada fluctúa alrededor de 170 mil hectáreas distribuidas en la mayor parte de las entidades del país y el volumen de producción obtenido es cerca de un millón de toneladas de fruto fresco, y se estima que alrededor del 80% de la producción es consumida en el país. (CONAPROCH, 2004).

2.2 Picudo del chile.

El picudo de chile ha sido considerado la mayor plaga de los chiles por más de ocho décadas en México y Estados Unidos (Elmore *et al.*, 1934; Riley y King, 1994).

En 1990, las pérdidas en los Estados Unidos de los cultivos de chile por el picudo de chile fueron estimadas en 23 millones de dólares en 31,000 hectáreas de cultivo en California, Nuevo México, Florida y Texas. Utilizando las mismas proporciones del daño (10%) estimado por Riley en 1994, el daño económico en el 2003 ha sido de más de 50 millones de dólares. En México, América Central y las islas del Caribe serio impacto económico es indicado pero no cuantificado (Riley y Schuster, 1994; Rodríguez 2006).

Adicionalmente a los costos se incluyen muchos efectos adversos en el medio ambiente ocasionados por pesticidas, exposición a organismos no-específicos, resistencia a

pesticidas y plagas secundarias en el mismo cultivo (Doutt *et al.* 1971; Van Driesche y Bellows, 1996).

2.2.1 Distribución.

El picudo de Chile es originario de México y fue descrito originalmente en Guanajuato por Cano; se localiza prácticamente en todas las zonas productoras de Chile del país (Reyes, 1984; Servín, 2000).

Su distribución geográfica es muy amplia, pues ha sido reportada desde las Islas del Caribe, América Central, México, el Sur de los Estados Unidos y Hawai (Elmore *et al.*, 1934; Velasco, 1969; Burke & Woodruff, 1980; Abreu y Cruz, 1985; Rodríguez-Leyva, 2007).

Actualmente *A. euginii* está presente en todos los cultivos de Chile ubicados en la parte norte de América incluyendo Guatemala, El Salvador, Honduras, Nicaragua, Puerto Rico, Costa Rica, Jamaica, y Panamá donde este insecto es considerado un serio problema de los chiles (Toapanta *et al.*, 2005; Schuster, 2007).

2.2.2 Ubicación taxonómica.

La clasificación taxonómica del picudo de Chile es Phylum: Artropoda, Subphylum: Mandibulata, Clase: Insecta, Orden: Coleoptera, Suborden: Poliphaga Superfamilia: Curculionoidea Familia: Curculionidae, Subfamilia: Anthonomidae, Tribu: Anthonomus Género: Anthonomus, Especie: euginii, Cano. (Arnett, 1973).

2.2.3 Biología del insecto.

El adulto tiene un tamaño promedio 3 mm y forma oval, color de caoba oscuro a gris brillante, hay 3 estadios y el número de generaciones por año depende solamente de la temperatura y la disponibilidad de alimento. Las plantas hospederas utilizadas por el picudo

de chile para reproducción son el genero *Capsicum* y *Solanum*, ambos son de la familia Solanaceae además de que se alimenta de otras especies de esta familia, pero solamente es una plaga en los chiles (*Capsicum* spp.) (Elmore *et al.*, 1934; Wilson, 1986; Patrock *et al.*, 1992). Estos insectos se posan sobre las yemas florales o los frutos pequeños, en donde ovipositan. Este puede completar su desarrollo larval en el fruto y/o flores de la mayoría de los tipos y variedades de chile y en varias belladonas (Servín, 2000; García, 2001; Schuster, 2007). Son las larvas las que se alimentan de los frutos pequeños ocasionando el daño y afectando tanto la calidad como la cantidad de la cosecha (Seal *et al.*, 2002).

Las cinco especies de chile utilizadas para cultivo (*C. annuum*, *C. frutescens*, *C. chinense*, *C. pubescens* o *C. baccatum*) son susceptibles a oviposición y desarrollo del picudo de chile (Elmore *et al.*, 1934; Patrock *et al.*, 1992).

2.3 Métodos de control del picudo de chile.

El picudo del chile reinfesta campos cosechados además de plantas hospederas secundarias y el patrón de agrupamiento que sigue hace difícil el monitoreo para detectarlo por lo cual existen diferentes métodos para su detección; tales como inspección de yemas terminales y auxiliares, uso de trampas amarillas, conteo directo de picudo por redadas, búsqueda de daño por oviposición o alimentación y utilización de trampas por feromonas (Servin, *et al.*, 2007). De ahí que los estudios de la relación entre el daño al cultivo y los niveles de infestación sugieren los siguientes criterios para optar por la aplicación de insecticidas y prevenir pérdidas económicas: 1) 5% de terminales dañadas o 2) un barrenillo por 200 plantas, inspeccionando dos yemas terminales por planta (Alonso, 1995; Lagunas, 1990).

Una recomendación general para el control del picudo, cuando es un problema, es aplicar insecticidas periódicamente desde antes floración hasta la cosecha (Riley y Schuster, 1992), pero dicha práctica ha entrado en desuso porque promueve un excesivo uso de insecticidas, sin embargo gracias a nuevos estudios se confirma que no es necesario realizar un excesivo número de aplicaciones sino cuatro aplicaciones por temporada en la 8ª y 11ª semanas de floración (Servin *et al.*, 2007).

2.3.1. Control químico y cultural.

Las prácticas actuales para controlar al picudo de Chile consisten de una combinación de control químico y cultural. Desde mediados de 1940's a 1980's el control químico ganó favor por la disponibilidad de insecticidas sintéticos (Elmore y 1954; Riley y King, 1994; Servin, 2007).

Ha permitido mantener poblaciones de la plaga en bajos niveles, pero a raíz del uso intensivo, cada día se reduce el número de insecticidas capaces de ejercer un control satisfactorio, debido principalmente al desarrollo de resistencia, considerando que solo el 1% del compuesto químico llega al insecto de manera directa, además de causar daños al ambiente. Los insecticidas proveen selectividad en otras plagas, pero estos no proveen una eficacia en el picudo de Chile debido a la biología de las larvas de este coleóptero, que pasa todos sus estadios en el interior del fruto de Chile, por lo que no es posible conseguir un control total a través de la lucha química.

2.3.4 Control biológico.

Es usualmente considerado una parte integral del MIP (Manejo integral de plagas) para cualquier plaga, enemigos naturales del picudo de Chile en Florida no han mostrado un papel importante en la supresión de esta plaga (Elmore y Campbell 1954, Wilson 1986,

Schuster *et al.* 1999). El único control biológico que ha sido manejado es con ciertos parásitos himenopteros de las larvas como *Catalaccus Hunteri*, *Triaspis eugenii*, *Urosigalphus* sp. (García, 2001; Seal et al., 2002; Rodríguez, 2007).

Otras alternativas al control biológico y químico es lo reportado por Quiñones y Lujan (2002) quienes indicaron que algunas variedades de Jalapeños presentaron mecanismos de tolerancia al daño de esta plaga. Desafortunadamente, no hay una sola variedad de cultivo conocida que provea alguna característica de resistencia importante a esta plaga.

2.4 Bacterias con potencial bioinsecticida.

Las plantas, insectos y otros organismos han tenido que coexistir por más de 3,000 millones de años. Durante este tiempo estos han desarrollado mecanismos de defensa produciendo metabolitos tóxicos que atacan a otros organismos como insectos, bacterias y hongos (Rong, 2002). El uso de microorganismos patógenos y sus metabolitos para el control de insectos presenta varias ventajas, tales como especificidad, no contaminan el medio ambiente y no son tóxicos para el hombre (Oliveira *et al.*, 2006).

Las bacterias constituyen el grupo más numeroso y quizás el más estudiado entre los microorganismos asociados con insectos en relaciones simbióticas y no simbióticas (Heimpel, 1967; Falcón, 1971). En general los entomopatógenos bacteriales se agrupan en: a) cristalíferas formadoras de esporas; b) patógenos obligados; c) patógenos facultativos y d) patógenos potenciales.

Las bacterias con potencial de control biológico pertenecen a los géneros *Agrobacterium* spp., *Alcaligenes* spp., *Arthrobacter* spp., *Bacillus* spp., *Cellulomonas* spp.,

Enterobacter spp., *Pseudomonas* spp. y *Serratia* spp. (Weller, 1988; Pechy *et al.*, 2008). Además se ha reportado actividad insecticida de *Streptomyces* sp. 173 de origen marino en *Helicoverpa armigera*, por lo cual los autores proponen a esta bacteria como posible fuente de bioinsecticida (Xiong, *et al.*, 2003).

Los insecticidas biológicos han sido utilizados por mas de 10 años (Russell y Brian, 2008) y *Bacillus thuringiensis* (Bt) es el microorganismo que tiene mayor aplicación como plaguicida biológico, utilizado para el control de insectos del orden Lepidoptera que afectan la agricultura, al hombre y animales. (Badii *et al.*, 1996; Brar *et al.*, 2006; Sauka y Benintende, 2008). Aunque estudios recientes señalan capacidad insecticida de Bt en insectos del orden coleoptera (Sezen , 2008).

El desarrollo comercial de formulaciones a base de Bt incremento ampliamente y de manera exitosa, debido a que su uso en el control de insectos perjudiciales para la agricultura ha dado respuesta a las expectativas de los productores (Falcon, 1971; Krieg y Herbert, 1984; Stanier *et al.*, 1986; Brar *et al.*, 2006). Este insecticida microbiano es producido en algunos países como Francia, Alemania, Checoslovaquia y Estados Unidos; las presentaciones del bioinsecticida se encuentran como formulaciones en polvo humectable o líquidos, granulados o en aerosol, los cuales contienen como ingrediente activo esporas, cristales, células vegetativas, o mezclas de ellas. Estas formulaciones son específicas para insectos, no causa daño a humanos y no produce residuos tóxicos. Lo que le permite ser utilizado en pastizales, cultivos frutícolas, hortícolas, forestales, ornamentales, etc. (Fernández y Esbttefanía, 1974; Ahmedani, 2007).

2.4. 1 Diversidad microbiana.

El objetivo principal de la ecología microbiana es entender la actividad microbiana en ambientes naturales, el conocimiento de los microorganismos y su hábitat es esencial (Klug y Reddy, 1983). Por lo que es de gran importancia poder describir la diversidad de las comunidades microbianas asociadas a muestras ambientales.

Para el aislamiento en el laboratorio de bacterias presentes en muestras de campo utilizando medios de cultivo, se requiere elaborar caracterizaciones fisiológicas de los aislamientos además de que solo una pequeña fracción del total de especies presentes se detecta en cultivo; sin embargo el estudio de la diversidad microbiana a través de las técnicas moleculares ha permitido obtener información sobre la composición y estructura de poblaciones y comunidades bacterias, establecer el impacto de los factores ambientales sobre la diversidad bacteriana y diseñar marcadores con fines de diagnóstico e identificación tanto de bacterias cultivables como no cultivables (Escalante *et al.*, 2004).

Una condición previa para describir la diversidad de la comunidad bacteriana es la caracterización de sus miembros (especies) de manera individual (Schwieger y Tebbe, 1998). Las técnicas moleculares permiten la detección y el monitoreo de bacterias del medio ambiente sin necesidad de cultivarlas, además de que han permitido aportar más datos que los métodos microbiológicos tradicionales y permiten realizar clasificaciones filogenéticas de manera rápida, precisa y eficaz (Jan y Borgne, 2001). El sistema génico que más se utiliza para caracterizar las comunidades bacterianas es el gen 16S del ADN ribosomal que está presente en todos los microorganismos vivos. Los genes del ARNr son altamente conservados y contienen un nivel de divergencia que permite que los microorganismos puedan ser diferenciados (Ovreas, 2000; Arias *et al.*, 2005). Se tienen

caracterizados oligonucleótidos de amplio rango (universales) y específicos, que pueden distinguir dentro y entre grupos filogenéticos de bacterias (Dohrmann y Tebbe 2004).

La técnica de conformaciones polimórficas de cadena sencilla o SSCP es un método que se utilizó originalmente para la detección de mutaciones y fue adaptado para el análisis y diferenciación de cultivos puros de microorganismos aislados de suelos y comunidades microbianas no cultivables de la rizosfera (Miethling *et al.*, 2000; Tebbe *et al.*, 2001; Schwieger y Tebbe, 2000; Schwieger y Tebbe, 2003). Por lo que la técnica PCR-SSCP ofrece una herramienta simple, económica y sensible para detectar si existen o no fragmentos de ADN idénticos en una secuencia (Sunnucks *et al.*, 2000). Aunque Ritchie *et al.* (2000) señalan que únicamente los miembros dominantes y activos de la comunidad, pueden ser detectados y miembros raros de la comunidad pueden no ser detectados.

2.5 Bioensayos de actividad insecticida.

Para un desarrollo eficaz de los bioinsecticidas, se requieren de pruebas de laboratorio bien establecidas con el fin de seleccionar microorganismos sobresalientes con capacidad insecticida, por lo que es necesario tener un modelo biológico que cumpla una característica importante, la disponibilidad de individuos en cualquiera de sus estadios, esto se logra estableciendo crías de insectos en el laboratorio.

Las poblaciones generadas en el laboratorio deben preservar características similares a las poblaciones silvestres y es necesario llevar un control de calidad monitoreando distintos parámetros que evalúen la colonización como el desempeño del insecto, a través de observaciones del ciclo de vida y evaluaciones de enzimas específicas

por lo que se requiere conocer el tipo y características de las enzimas que actúan en la especie en cuestión.

El conocimiento de un perfil enzimático del insecto no solo permite tener un indicativo del estatus fisiológico de este en condiciones de laboratorio sino que además sienta bases para determinar el mecanismo y el modo de acción de los compuestos activos generados por los microorganismos con capacidad insecticida.

2.5.1 Cría de insectos.

La cría de insectos con diversos fines ha sido objeto de interés. Esta actividad se practica desde hace 7000 años (Singh y Moore, 1985). Es vital para la entomología básica y aplicada ya que la capacidad de criar insectos masivamente facilita enormemente la evaluación de insecticidas, investigación sobre síntesis, evaluación de feromonas, atrayentes y otras sustancias capaces de modificar el comportamiento insectil; identificación o desarrollo de germoplasma vegetal que tiene resistencia a insectos plaga, producción y propagación de microorganismos entomopatógenos, entre otros.

2.5.2 Enzimas hidrolíticas.

Todo lo que esta relacionado con la vida y el comportamiento de los insectos, depende de cambios químicos en el interior de su cuerpo. La saliva de los insectos contiene enzimas que inician el proceso de digestión, facilitan la liberación de nutrientes, ayudan en el movimiento de los estiletes del insecto durante su alimentación o sirven para contrarrestar o neutralizar los productos producidos por las plantas para entorpecer la alimentación de sus insectos parásitos. Las enzimas son en extremo específicas con relación al sustrato sobre el que intervienen y necesarias en muy pequeña proporción al sustrato. Su actividad es afectada por el pH, temperatura y solo catalizan una reacción.

Frecuentemente las enzimas hidrolíticas aparecen como un caldo o mezcla, con la dominancia de aquella que va atacar la sustancia más abundante en la dieta. Las proteasas son enzimas del aparato digestivo que degradan proteínas para que puedan ser absorbidas por el intestino.

El grupo de enzimas estererasas se reconoce como uno de los sistemas más importantes en el metabolismo de compuestos xenobióticos, y su mecanismo está asociado con la producción masiva y de secuestro de enzimas hidrolíticas en varias especies de Insectos (Devonshire 1977, Mouches *et al.* 1987).

Las fosfatasas son las enzimas detoxificadoras asociadas al incremento a la resistencia a insecticidas organofosforados (Bissel, 2002). Además de que se a demostrado un rol importante en la resistencia a congelación en varios insectos (Pfister y Storey, 2005).

III. HIPOTESIS.

Las bacterias mesófilas asociadas al cultivo de chile tienen capacidad insecticida en el modelo *Anthonomus eugenii* Cano debido a la actividad enzimática que genera cambios en el metabolismo o comportamiento del insecto.

IV. JUSTIFICACION.

La bibliografía existente y los resultados de la implementación de métodos de control en la agricultura tradicional evidencian alteraciones en el equilibrio del agrosistema. Dando como consecuencia el desbalance del sistema con la consiguiente proliferación de plagas.

Este mismo descontrol ha dado como resultado un uso irracional de los pesticidas sintéticos que se aplican para proteger a dichos cultivos. Ocasionando un estrés considerable al medio ambiente, la inducción de resistencia en insectos y daños a la salud pública manifestándose problemas toxicológicos sobre humanos, mamíferos y organismos de diversos ecosistemas.

De aquí la necesidad de buscar alternativas de protección no perjudiciales como lo es la aplicación de productos de origen natural, sustentando así la producción agrícola y el cuidado del medio ambiente con sustancias ambientalmente agradables al acumularse en los organismos, biodegradables y más seguras que los pesticidas sintéticos. Por lo que los microorganismos representan una alternativa potencial como agentes de control biológico o biopesticidas.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar actividad insecticida de bacterias asociados al cultivo de chile (*capsicumm spp.*) en el modelo *Anthonomus eugenii* Cano (picudo de chile).

5.2 Objetivos particulares

- 1) Aislamiento de bacterias asociadas al cultivo de chile verde y determinación del perfil de las comunidades bacterianas naturales en frutos sanos y con plaga por la técnica de conformaciones polimórficas de cadena sencilla (SSCP).

- 2) Establecimiento de condiciones controladas para la cría del insecto y determinación de las enzimas hidrolíticas presentes en su ontogenia.

- 3) Evaluación de la actividad insecticida de las bacterias en el insecto *A. eugenii* Cano.

VI. MATERIALES Y METODOS.

6.1 Recolección de muestras.

Con el fin de obtener bacterias asociadas al cultivo de chile verde y en los distintos estadios del insecto plaga picudo de chile, primero se hizo una colecta de frutos y picudos adultos de manera aleatoria en cultivos de chile ubicados en el Carrizal y en el Valle de Santo Domingo, B.C.S. donde se presentó la plaga.

Al no poder diferenciar eficazmente si la comunidad bacteriana asociadas al fruto variaba en función del contacto o no del picudo de chile se realizó un segundo muestreo de chile verde expuesto de manera controlada al insecto plaga, de la siguiente manera, se manejo un total de 20 plantas con fruto inmaduro las cuales fueron cubiertas con tela de organza cuidando de no dejar zonas abiertas para evitar el escape de picudos que se liberaron dentro de las plantas cubiertas por más de 48 h; a la par se asigno a 6 plantas como control que nunca se expusieron al picudo de chile (Figura 1).



Figura 1. Exposición controlada de la plaga picudo de chile en plantas de chile verde en la etapa fenológica de producción. El cultivo se desarrollo en un invernadero bioseguro, libre de pesticidas químicos del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste.

Para recolectar las muestras de frutos en las diferentes áreas de muestreo se utilizaron recipientes de 50 mL estériles. En los campos de cultivo abandonados se realizó sólo una colecta y en el expuesto de manera controlada al *A. eugenii* Cano se recolectaron muestras a las 48 h y una réplica después de 48 h en la misma planta muestreada anteriormente, las plantas control fueron muestreadas antes y después del tratamiento (exposición al picudo).

Las muestras de *A. eugenii* adulto y de las larvas obtenidas de frutos infestados manipulados en condiciones estériles en una campana de flujo laminar se colocaron en tubos de 1.5 mL estériles. Después de la colecta todas las muestras eran transportadas en hielo para su tratamiento en el laboratorio de Patogénesis Microbiana.

6.1.1 Aislamientos Bacterianos.

Las muestras de los insectos y las de frutos de chile colectadas en campo se lavaron con solución salina 0.9% estéril durante la noche en agitación a 37 °C, esta solución de lavado es el extracto de ADN bacteriano de la superficie del insecto y del chile, del cual se tomo 1 mL que fue transferido a caldo tripticaseina de soya (TSB)(BD Bioxon) con ciclohexemida a 50 µg/mL (Sigma C-7698) incubado a 37 °C por 24 hr con agitación orbital (Incubadora La-Line). De esta manera se obtuvo en cultivo el gupo de bacterias mesófilas patógenas y saprofitas, tanto de la superficie del chile como del insecto. El aislamiento de cepas puras se llevo a cabo por morfología en TSA y la preservación de estas en TSB/glicerol 1:1 almacenadas a -80 °C en un ultracongelador (VWR Scientific). Se realizó la prueba de *Bacillus* spp. en las muestras de

los insectos adultos, calentando la dilución 10 por 20 minutos a 80 °C en un baño María. Luego se cultivó en agar tripticaseína de soya (BD Bioxon).

6.1.2 Colecta de larvas y adultos de picudo de chile

Se realizó la colecta de insectos en campos agrícolas de Chile en la localidad del Carrizal y Valle de Santo Domingo, B.C.S.

La colecta de adultos se hizo en frascos transparentes de plástico y en bolsas de papel se recolectó frutos infestados de la planta de Chile para transportar al laboratorio y obtener las larvas para su propagación.

6.2 Determinación del perfil de poblaciones bacterianas por la técnica de conformaciones polimórficas de cadena sencilla (SSCP).

6.2.1 Aislamiento de ADN bacteriano

Las muestras de extractos de ADN bacteriano y las de bacterias cultivables obtenidas de la superficie del fruto de Chile (identificado con letra CH) y del insecto (identificado con letra P) fueron tratadas con dos métodos para el aislamiento del ADN genómico bacteriano.

a) Método enzimático.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación 14000 rpm por 2 min. y 25 °C (Beckman Microfuge E), se descartó el sobrenadante y el botón formado se resuspendió en 575 µL de TE, 30 µL de SDS al 10% (Buffer de lisis) y 3 µL de Proteínasa K (20 mg/mL) y se agregaron 0.5 g de perlas de vidrio. Se agitó en vortex durante 3 min. posteriormente se incubó durante una hora a 37°C. Transcurrido el tiempo se adicionaron 100 µL de NaCl

5 M y 80 μ L de CTAB/NaCl se mezcló por inversión e incubando 10 min. a 65°C (Dri-Bath Thermolyne). Se realizó la primera extracción con un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1 v/v), se agitó en vortex hasta obtener una solución lechosa, se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min. y 25°C, la fase acuosa se transfirió a tubos de 1.6 mL estériles para la segunda extracción con un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), mezclándose por inversión. Los tubos se centrifugaron 14,000 rpm por 5 min. a 25°C, el sobrenadante se recuperó en tubos 1.6 mL estériles y la precipitación del ADN se realizó con un volumen de Etanol absoluto preenfriado a -20°C. Los tubos se incubaron a -20° C durante toda la noche. Para la recuperación del ADN los tubos se centrifugaron 14,000rpm por 20 min. a 4°C, al botón obtenido se le realizó dos lavados con etanol al 70% centrifugando 20,817xg por 10 min. a 4°C. El botón se dejó secar al aire y se resuspendió en 50-100 μ L de TE. Se adicionó 1 μ L de ARNasa (10 μ g/ μ L) se incubaron a 37 °C (Dri-Bath Thermolyne) por una hora. Para eliminar la ARNasa se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v) como el procedimiento antes mencionado.

b) Kit fast DNA bio 101 systems.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación 14,000 rpm por 2 min. a 25°C (Beckman Microfuge E), se descartó el sobrenadante y el botón formado se resuspendió en 1000 μ L de solución CLS-TC agregando 0.5g de perlas estériles y se homogenizó en vortex por 3 minutos. Los tubos se centrifugaron a 14,000 rpm por 10 min. a 4°C. Se tomaron 600 μ L del sobrenadante y se transfirieron a tubos estériles con 600 μ L de solución Binding Matriz mezclando suavemente y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó

14,000 rpm por 1 min. a 4°C y se descarto el sobrenadante. El botón se resuspendió en 500 µL de SEWs-M agitándose cuidadosamente con una pipeta. Los tubos se centrifugaron 14,000 rpm por 1 min. a 4°C y se descarto el sobrenadante, se volvió a centrifugar 10 segundos y se removió los residuos líquidos con una punta pequeña de micropipeta. Se eluyó el ADN del Binding Matriz resuspendiendo suavemente en 100 µL de DES y se incubó 2-3 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugaron los tubos a 14,000 rpm por 1 min a 4°C. Se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo con punta grande para evitar la ruptura del ADN.

El ADN se cuantificó en un espectrofotómetro SmartSpec 3000™ (BIO RAD) a 260 y 280 nm de absorbancia y se visualizó en geles de agarosa al 1% teñidos con 1 µL de bromuro de etidio (10 mg/mL) y buffer TBE 1X (0.089 M Tris, 0.88 M ácido bórico, 0.5 M EDTA, pH 8.0). De cada muestra se tomaron 5 µL y se mezclaron con 2 µL de buffer de carga (LB: 50% glicerol, 0.1 M EDTA pH 8.0, 0.25% de azul de bromofenol) (Sambrook *et al.*, 1989). Como estándar se utilizaron 2 µL de marcador molecular (MW) conocido comercialmente como DNA Molecular Weight Markers, ROCHE. La electroforesis se corrió a 80V durante 60 minutos. Los resultados fueron visualizados bajo luz UV y documentados en un sistema de fotodocumentación UVITEC (UVP Inc®).

6.2.2 Amplificación por la técnica de PCR

Mediante la técnica de PCR se amplificaron segmentos de las regiones variables del gen 16S para bacterias, utilizando de oligonucleótidos Com1(Forward) y Com 2-Ph (reverse) (Tabla I).

Tabla I. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de segmentos específicos de las regiones variables del gen ribosomal 16S (Tebbe *et al.*, 2001).

Oligonucleotidos	Secuencia	Región	Tamaño del Producto
COM1F	5' CAG CAG CCG CGG TAA TAC 3'	V4 y V5	407 pb
COM2R	5' CCG TCA ATT CCT TGG AGT TT 3' *		

*oligonucleotido fosforilado para la técnica de SSCP

Cada reacción de amplificación contenía 100 ng de ADN, 2.5 pmol de cada oligonucleotido, 2.5 µL de buffer 10X PCR con MgCl₂, 5 mM de dNTP's, 0.625 U de Taq polimerasa (Invitrogen) y agua mili-Q estéril para tener un volumen final de 25 µL. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador TECHNE TC-312[®], con el programa citado en la.

Temperatura	Tiempo	No. de ciclos
94° C	7'	1
94° C	60''	30
50° C	60''	
72° C	70''	
72° C	5'	1
4 °C	∞	

Tabla II. Programa de PCR para la amplificación de regiones variables del gen 16S (Tebbe *et al.*, 2001).

Los productos de PCR se evaluaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y buffer TBE 1X (Sambrook *et al.*, 1989). De cada reacción se tomaron 5 μ L y se mezclaron con 2 μ L LB. Como estándar se usaron 2 μ L de marcador molecular (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE). La electroforesis se corrió a 80V durante 60 minutos; los resultados fueron documentados como se menciona anteriormente.

6.2.3 Purificación, digestión y desnaturalización de los productos de PCR

La purificación de los productos de PCR se llevo a cabo con el Kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) siguiendo las especificaciones del fabricante. La digestión de los productos de PCR para remover la hebra fosforilada se realizo con 5U de la enzima lambda exonucleasa (Biolabs) y los productos digeridos se purificaron mediante el Kit MinElute PCR Purification (QIAGEN) de acuerdo a lo indicado por el fabricante.

La desnaturalización de las cadenas sencillas de ADN (ssADN) se llevo acabo adicionando 9 μ L a cada muestra del reactivo desnaturalizante “Loading dye” (10 mM NaOH; 0.25% Xilano Cianol (wt/vol); 0.25% Azul de Bromofenol (wt/vol); 95% Formamida (vol/vol) incubando a 95 °C por dos minutos y se colocaron inmediatamente en hielo hasta su uso.

6.2.4 Electroforesis de geles de poliacrilamida

La corrida de la prueba se llevara a cabo en un MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X con una solución buffer de corrida TBE 1X preenfriado en la cámara Decode Universal Mutation Detection System (Bio-Rad Inc., Hercules, CA) en condiciones de 400V 50mA

20W por 19 h a 20 °C. El revelado de las bandas se lleva a cabo con la tinción de plata y secado a temperatura ambiente. (Bassan, *et al.*, 1991; Schwieger *et al* 1998; Sunnucks, 2000; Tebbe, 2001). Los geles se foto-documentaron en un scanner densitométrico UMAX Powerlook 2100 XL.

6.2.5 Secuenciación e identificación taxonómica

Resulta impracticable utilizar el concepto especie bacteriano para cada banda obtenida en el SSCP por lo que se les definió como una unidad taxonómica operacional (OTU) ya que la asignación taxonómica de los individuos es operacional y con base en su secuencia en la región parcial del gen que codifica para el 16S ARNr (Schloss y Handelsman, 2005). Las bandas más representativas de los perfiles de SSCP fueron cortadas del gel y se realizó la extracción del ADN, mediante el método “Crush and Soak” (Sambrook *et al.*, 1989). Cada sección de acrilamida se colocó en un tubo y se adicionaron 150 µL de solución de elusión (0.5 M acetato de amonio, 10 mM de acetato de magnesio, 1 mM EDTA pH 8.0 y SDS 0.1%) fragmentando la acrilamida con una punta de micropipeta. Los tubos se incubaron 3 h a 37°C, posteriormente se centrifugaron 13,400xg por 2 min a 24°C, el sobrenadante se paso a un tubo limpio; a la acrilamida remanente se le adiciono 50 µL mas de solución de elusión, procediéndose de la forma antes mencionada. Los sobrenadantes se juntaron y el ADN se precipito adicionando 1 volumen de Etanol absoluto preenfriado a -20° C. Los tubos se incubaron a -20°C toda la noche, transcurrido el tiempo de incubación los tubos se centrifugaron a 17,530xg por 20 min a 4°C. Al botón obtenido (ADN) se le realizaron dos lavados con etanol al 70%, se dejo secar al aire y se resuspendió en 10 µL de

TE. Posteriormente, este ADN fue el templado que se uso para re-amplificar utilizando los mismos oligonucleótidos y programa citados en las tablas 1 y 2 (Schwieger y Tebbe, 2000).

Los productos se evaluaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio y buffer TBE 1X, Como estándar se usaron 2 μ L de marcador molecular (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE).

Los productos de PCR obtenidos fueron secuenciados por el método de Sanger (Sambrook *et al.*, 1989) en un equipo ABI3730XL para su secuenciación por la empresa MACROGEN (<http://www.macrogen.com>).

La edición y el análisis de alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CHROMAS 2.33 y Finch TV, mientras que el alineamiento Blast se uso para determinar la homología entre secuencias obtenidas y aquellas incluidas en las bases de datos mundiales en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

6.2.6 Árboles filogenéticos

La relación filogenética de las bacterias fue obtenida mediante el análisis de la secuencia parcial del gen ribosomal que codifica la subunidad 16S rADN, las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando el modelo de alineamiento más cercano por terminación de espacio (NAST) (DeSantis *et al.*, 2006) disponible gratuitamente en internet en la pagina de GreenGenes (<http://greengenes.lbl.gov>). Se utilizó el modelo Weighbor para construir los árboles filogenéticos de estas secuencias utilizando el programa Tree Builder versión en línea disponible en la pagina Ribosomal Database Project (RDP II) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Maidak *et al.*, 1999; Maidak *et al.*, 2001).

6.2.7 Análisis de perfiles de SSCP

Para realizar los análisis de similitud de los perfiles bacterianos se utilizó el software GelCompar II (Applied Math, Kortrijk, Belgium). Se normalizaron con un marcador de bacterias externo. El análisis de agrupamiento o CLUSTER utilizado fue el UPGMA con medida aritmética.

6.3. Cría del insecto.

6.3.1 Mantenimiento y Propagación.

Los frutos infestados recolectados se mantuvieron en el campo agrícola experimental del CIBNOR en bandejas cubiertas con organza en condiciones ambientales. Diariamente se recolectaron los picudos que emergieron y se transportaron al laboratorio para su mantenimiento.

En el laboratorio los insectos adultos colectados se mantuvieron a una temperatura de 22- 25 °C sin fotoperiodo, en botes de plástico con toallas de papel para absorber la humedad y se alimentaron con chile ancho y/o jalapeño obtenidos de un cultivo establecido en el Campo Experimental libre de pesticidas del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste libre de pesticidas (Figura 2).

Para establecer el tamaño de chile a utilizar para oviposición a las condiciones preestablecidas se realizó oviposición de 48 hr con 12 replicas.

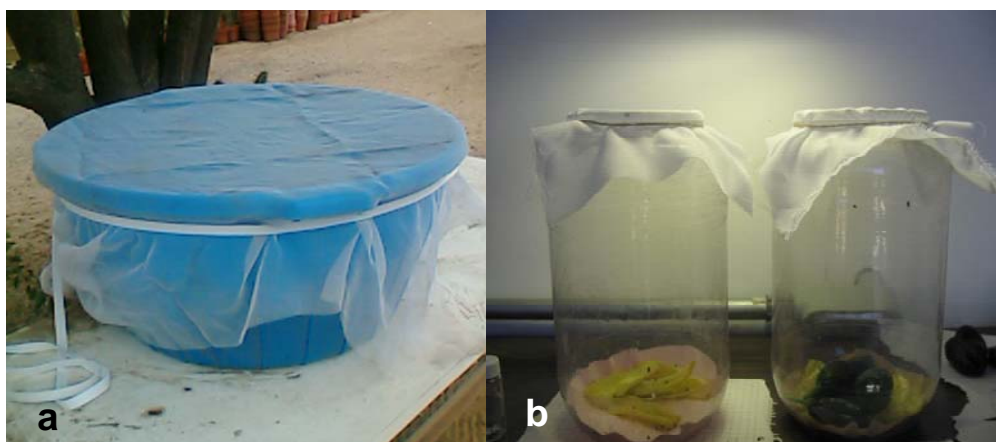


Figura 2. a) Contenedores de frutos infestados para obtención masiva de picudos de chile adultos. b) Frasco de plástico para cría de los insectos en todos sus estadios en condiciones de laboratorio.

Se inicio la colonia de insectos con al menos 542 picudos de chile y se utilizaron 20 frutos enteros de chile ancho y jalapeño inmaduros en grupos de 5 y la oviposición se efectuó en 48 h y los frutos ofrecidos a los picudos adultos se colocaron en condiciones similares a las descritas anteriormente. Una nueva oviposición se realizo diariamente monitoreándose 7 al mismo tiempo. Se hicieron observaciones diarias y los picudos adultos que emergieron se colectaron manualmente descartando los frutos al mes. Los picudos colectados se colocaron en los frascos y alimentaron con frutos libres de pesticidas.

Durante el mes se realizaron observaciones en el estereoscopio, de los huevecillos, los diferentes estadios de larvas y pupa hasta que emergieron los picudos adultos con el fin de detectar algún cambio morfológico por las condiciones de laboratorio. Estas muestras se documentaron en fresco con fotografía digital y posteriormente fueron procesadas hasta secado crítico, recubiertas con iones de paladio en un rociador de metales al vacío Denton Vacuum Desk II. para las observaciones en el Microscopio Electrónico de Barrido Hitachi S-3000N).

6.3.2 Análisis de la actividad enzimática en el *A. eugenii*

Se analizó en toda la ontogenia del insecto la actividad enzimática mediante el sistema de investigación de actividades enzimáticas API ZYM; BioMérux de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Es un micrométodo semicuantitativo que permite estudiar rápida y simultáneamente 19 actividades enzimáticas (Tabla III). Las actividades enzimáticas se expresaron como el sustrato hidrolizado en nanomoles por miligramo de proteína (nmol/mg proteínas).

Tabla III. Enzimas con su respectivo sustrato detectadas en el Sistema API ZYM.

Enzima	Substrato
Esterasa (C4)	2-naftil butirato
Esterasa lipasa (C8)	2-naftil caprilato
Lipasa (C14)	2-naftil miristato
Leucina arilamidasa	L-leucil-2-naftilamida
Valina arilamidasa	L-valil-2-naftilamida
Cistina arilamidasa	L-cistil-2-naftilamida
Tripsina	N-benzoil-dl-arginina-2-naftilamida
Quimiotripsina	N-glutamina-fenilalanina-2-naftilamida
Fosfatasa alcalina	2-naftil-1-fosfato
Fosfatasa acida	2-naftil-1-fosfato
Fosfohidrolasa	Naftil ASBI-fosfato
α -Galactosidasa	6-Br-2-naftil-a-D-galactopiranosida
β -Galactosidasa	2-naftil-1-b-D-galactopiranosida
β -Glucuronidasa	Naftil-1ASBI- β -d-glucuronida
α -Glucosidasa	2-naftil-1-2-D-glucopiranosida
β -Glucosidasa	6-Br-2-naftil-1- β -D-glucopiranosida
α Glucosaminidasa	1-naftil-1-N-acetil-1- β -d-glucosaminida
α -Manosidasa	6-Br-2-naftil-1-2-D-manopiranosida
α -Fucosidasa	2-naftol-1-fucopiranosida

6.3.3 Cuantificación de proteínas

La determinación de proteína soluble se realizó con el método Bradford (1976) que se basa en la utilización del colorante azul de Coomassie G-250®. La presencia de proteínas favorece el desplazamiento del equilibrio hacia la forma aniónica del compuesto debido a la interacción de los grupos sulfónicos del Coomassie con los grupos catiónicos de las cadenas laterales de algunos residuos aminoacídicos de las proteínas (principalmente Arginina y Lisina); produciéndose entonces la coloración azul que puede medirse a 595 nm, utilizando una curva estándar de albúmina sérica bovina (1mg/mL).

6.3.4 Análisis estadístico

La influencia de los estadios del insecto sobre los niveles de enzimas evaluadas por el sistema APY ZYM fue analizado por la Prueba de Friedman. Valor de $P < 0.05$ fue considerado como diferencia significativa.

6.4 Evaluación de actividad insecticida

De las bacterias aisladas en cultivo se realizó una selección de 50 bacterias, entre las que se incluyeron las aisladas por la metodología para *Bacillus* sp. y el resto por la diversidad morfológica para evaluar su potencial insecticida. Se utilizaron frascos de plástico de ¼ de pulgada donde se colocaron 10 insectos por tres repeticiones para un total de 30 insectos adultos por cada tratamiento, blanco y testigo.

Los picudos fueron alimentados y se observaron por 24 h transcurrido este tiempo se retiró la comida para mantenerlos en ayuno por 24 h para inicio del experimento (modificado Servín y Aguilar, ,2000).

Se considero como blanco a los picudos alimentados con un trozo de chile y testigo a los que se alimentaron con un trozo de chile con el medio de cultivo y los tratamientos eran trozos de chiles con la bacteria y sobrenadante de 72 h y el tiempo de exposición al tratamiento fue de 48 h.

Las bacterias que mostraron una actividad insecticida en el picudo de chile fueron identificadas con base a criterios morfológicos, tinción diferencial, pruebas bioquímicas y detección molecular (Nishiwaki, 2007).

VII. RESULTADOS.

Para conocer la diversidad bacteriana asociada al cultivo de chile específicamente en fruto y del insecto picudo de chile se utilizó la combinación de técnicas convencionales de microbiología y técnicas moleculares específicamente SSCP.

7.1 Aislamiento de bacterias.

Los aislamientos obtenidos del fruto del cultivo de chile en el medio nutritivo caldo tripticaseína de soya y resembrados en agar tripticaseína de soya se observaron de acuerdo a sus características morfológicas macroscópicas y microscópicas para realizar una selección de cepas y evitar duplicarlas; no se realizaron pruebas bioquímicas para identificación por lo que la morfología se utilizó como indicador de morfotipos.

La metodología descrita anteriormente permitió obtener 100 cepas de bacterias mesófilas como posibles candidatos a utilizados para evaluar actividad insecticida sobre el picudo de chile. De estas 78 fueron aisladas de los frutos de chile infestados y el resto de las bacterias se aislaron del insecto picudo de chile de las cuales 6 colonias pertenecen al género *Bacillus* spp. porque se utilizó una metodología específica para aislar este género. No se observó ningún aislamiento bacteriano en las larvas del insecto (Figura 3).



Figura 3. Aislamientos bacterianos de fruto de chile y del *A. eugenni* adulto.

7.2 Determinación del perfil de poblaciones bacterianas por la técnica SSCP.

Se obtuvo el ADN genómico bacteriano de la superficie del fruto de chile (CH) y del picudo de chile (P); el extracto de ADN bacteriano fue identificado con la letra S y el ADN genómico de las bacterias cultivables identificado con la letra M. Tal como se observa en la Figura 4.

Se amplificó la región variable (V4-V5) del gen 16S rADN con primers universales señalados en la metodología (Figura 5).

MW

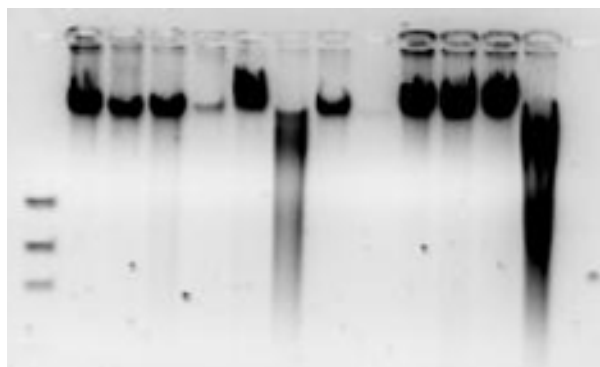


Figura 4. Muestras de ADN genómico de las bacterias aisladas en caldo TSB y de los extractos de ADN bacteriano. MW (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE).

MW

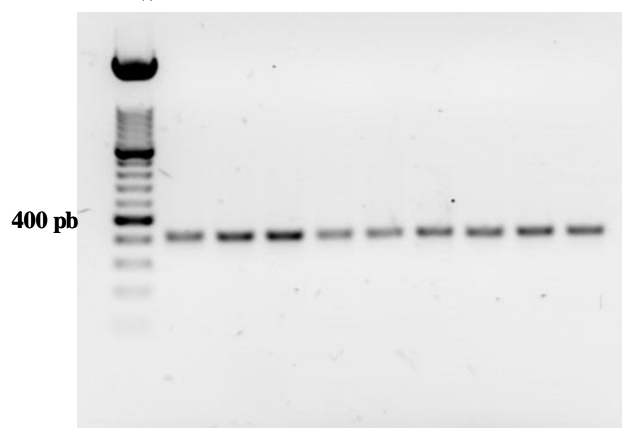


Figura 5. Productos de PCR del 16S rADN a partir de ADN genómico bacteriano de aproximadamente 400 pb. MW (DNA Molecular Weight Marker XVI, ROCHE).

Una vez amplificadas las muestras, los productos de PCR fueron purificados, se realizó la digestión de la cadena fosforilada con la enzima lambda exonucleasa y la desnaturalización de los productos de PCR para finalizar la técnica de SSCP se corrieron los geles de poliacrilamida para obtener los perfiles bacterianos y se seleccionaron las bandas que predominaron en los perfiles bacterianos o bien si presentaron abundancia indicada por la intensidad de la banda así como si estuvieron presentes en los distintos muestreos y finalmente si fueron específicas para algunos perfiles bacterianos.

De los muestreos de insectos *A. eugenii* adultos el patrón de bandas de las bacterias aisladas en medio de cultivo reflejan comunidades bacterianas presentes en ambos casos y además permanecen constantes. Son tres unidades taxonómicas operacionales (OTUs) dominantes y presentes en los patrones de bandeo. Una de estas comunidades bacterianas se encuentra tanto en los perfiles de muestras cultivo dependiente como en las de los extractos de ADN bacteriano y en estas últimas un OTU está presente en el 83% del total de las muestras y no se observa en las muestras de bacterias aisladas en medio de cultivo y la tercera comunidad más representativa se observa con mayor intensidad en las muestras cultivo dependiente (Figura 6a).

En la Figura 6b podemos observar los perfiles bacterianos de muestras de frutos de Chile del Carrizal. En el patrón de bandeo hay dos OTUs dominantes presentes tanto en las muestras de los extractos de ADN bacteriano como en las cultivo dependiente, además un OTU dominante que solo está en las muestras de bacterias aisladas en caldo TSB. Se presentan OTUs no dominantes en las de los extractos de ADN bacteriano aunque esto no es indicativo de una alta diversidad bacteriana.

El patrón de OTUs o bandeo de las muestras de frutos de chile colectadas en Cd. Constitución nos indica que al menos dos OTUs están presentes en las muestras de los extractos de ADN bacteriano y además son cultivables con medios tradicionales al observarse también en las muestras de bacterias aisladas en caldo TSB. Los perfiles bacterianos nos señalan una diversidad relativa pero algunos OTUs permanecen constantes (Figura 6c).

Los perfiles bacterianos obtenidos de la superficie de los frutos expuestos de manera controlada al insecto nos muestran que los OTUs están localizados en gran parte del gel, por lo tanto nos señala una alta diversidad bacteriana con respecto a los patrones de bandas del control al inicio y final del tratamiento. Además las muestras no señalan cambios significativos con respecto al tiempo de exposición. En el caso de los controles se observa perfiles muy heterogéneos con baja diversidad bacteriana (Figura 6d).

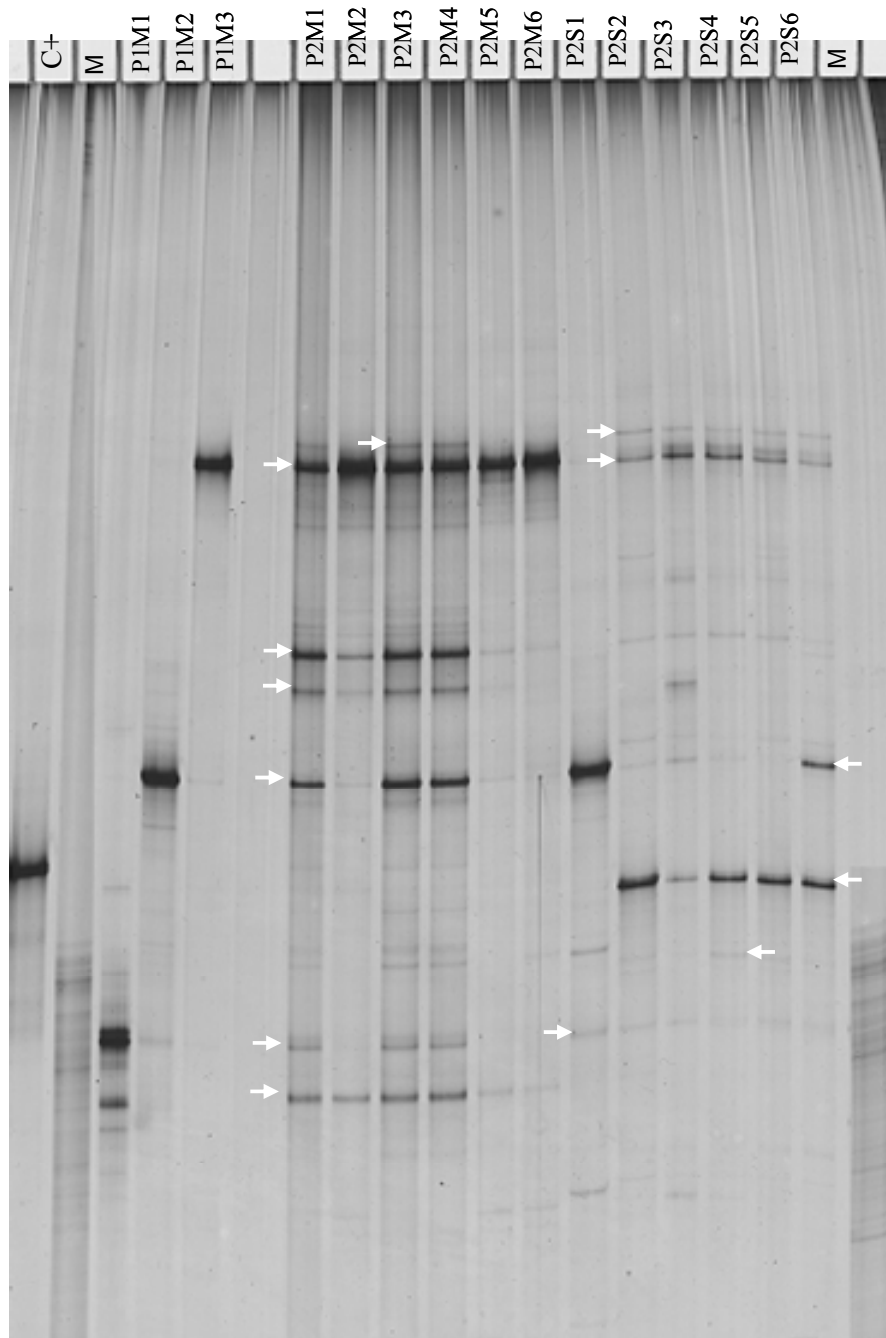


Figura 6a. Fotografía de MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de las muestras obtenidas de la superficie del picudo de chile en el Carrizal (P1) y en Cd. Constitución (P2), la letra M y S con números seriales indican a las bacterias cultivables y las de los extractos de ADN bacteriano respectivamente. Se indica en los carriles control positivo (C+), marcador estándar (M) y las flechas señalan aquellas bandas que fueron incididas reamplificadas y secuenciadas.

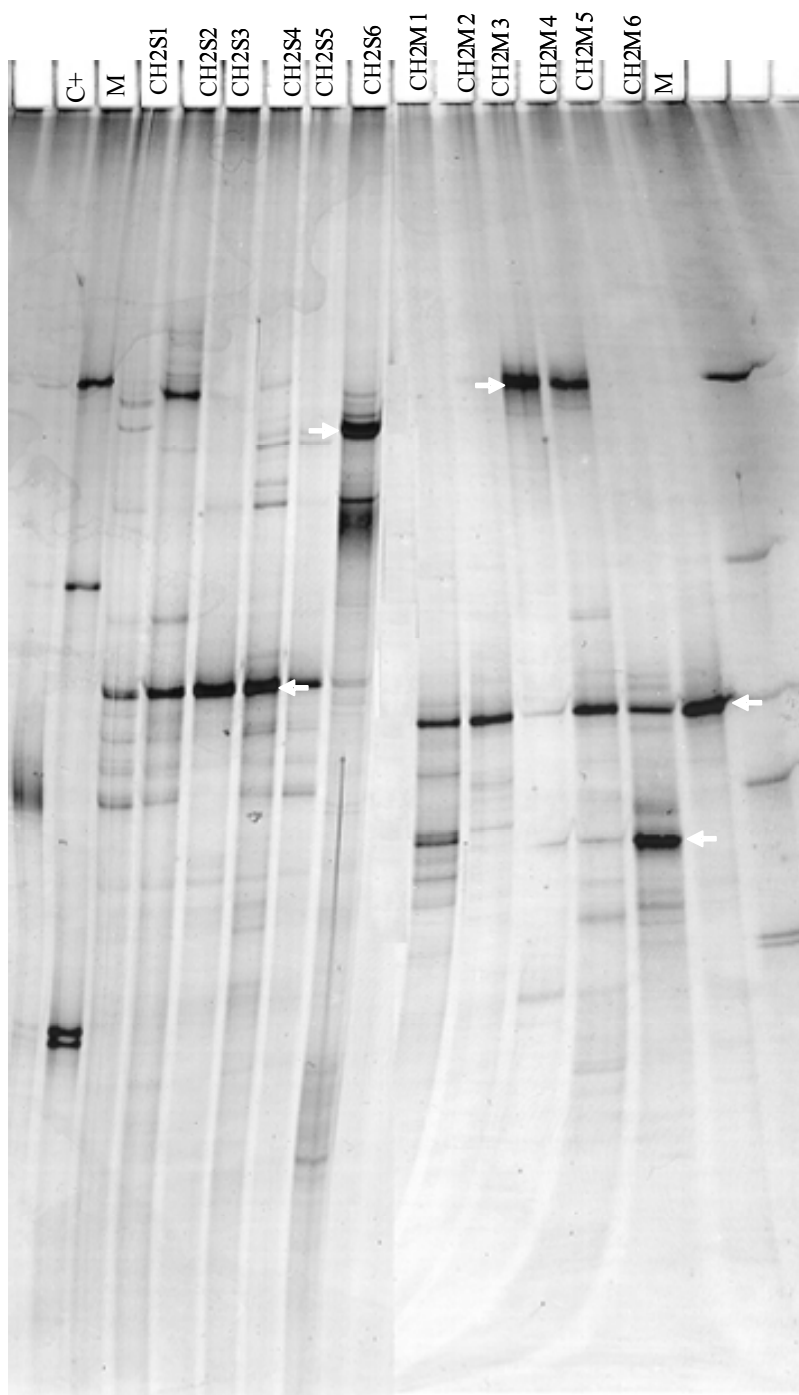


Figura 6b. Fotografía de MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de las muestras de frutos de Chile (CH2) colectadas en el Carrizal, la letra M y S con números seriales que indican a las muestra de bacterias cultivables y al extracto de ADN bacteriano respectivamente. Se indica en los carriles control positivo (C+), marcador estándar (M) y las flechas señalan aquellas bandas que fueron incididas reamplificadas y secuenciadas.

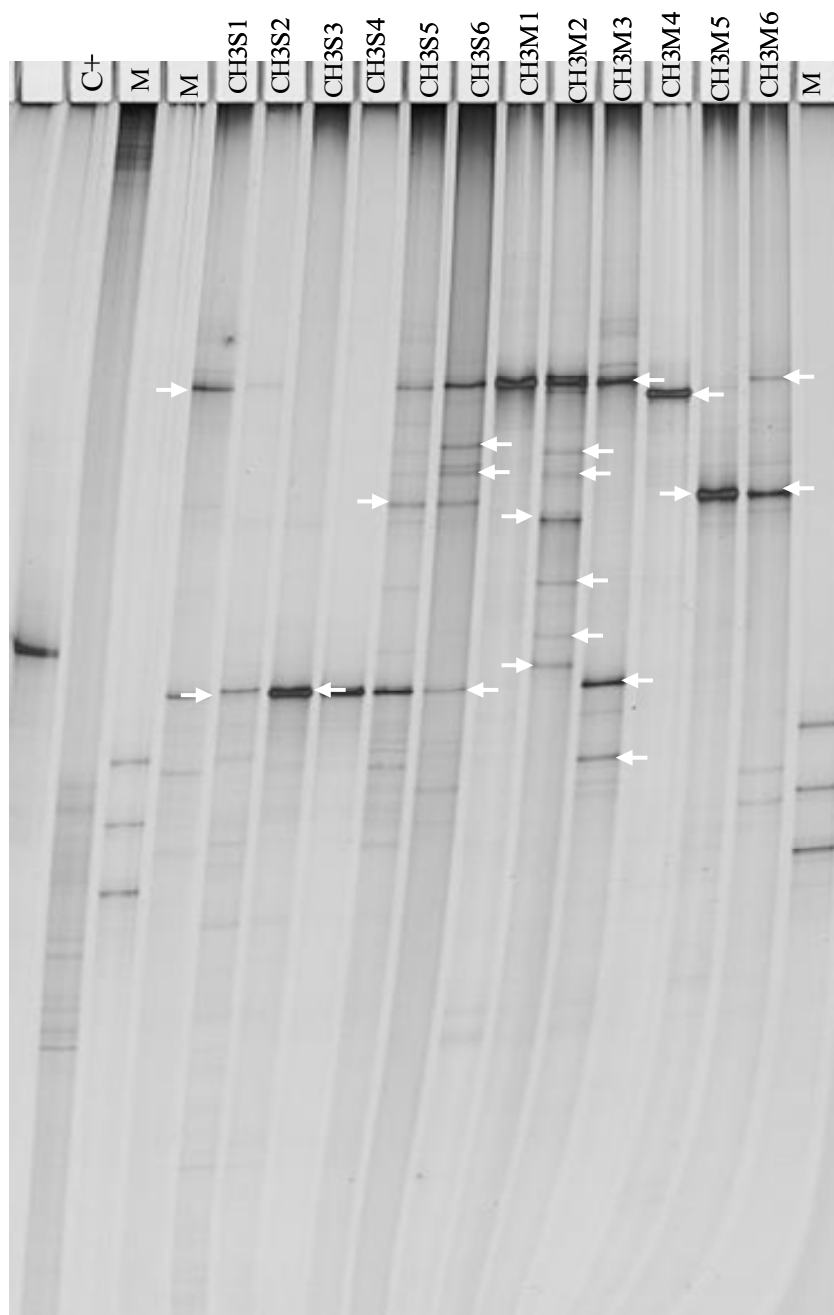


Figura 6c. Fotografía de MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de las muestras obtenidas de frutos de chile (CH3) colectadas en Cd. Constitución, , la letra M y S con números seriales que indican a las muestra de bacterias cultivables y al extracto de ADN bacteriano respectivamente. Se indica en los carriles control positivo (C+), marcador estándar (M) y las flechas señalan aquellas bandas que fueron incididas reamplificadas y secuenciadas.



Figura 6d. Fotografía de MDE-geles de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de las muestras de extractos de ADN bacteriano de frutos de chile expuestos de forma controlada al picudo de chile. Los carriles indican control positivo (C+), marcador estándar (M), tratamiento 48 h (Ti), tratamiento después 48 h (Tf), control inicial (Ci), control final (Cf) y números seriales que indican a las muestras. Las flechas señalan aquellas bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas.

En las muestras de bacterias cultivo dependientes los perfiles indican una diversidad bacteriana más abundante con respecto al control al finalizar el tratamiento, los grupos representativos de muestras arrojan perfiles consistentes con OTUs bien definidos. En la parte inferior del patrón de corrida se observa OTUs en todas las muestras control y tratamiento, lo cual nos indica específicamente que esta unidad taxonómica está asociada a estas muestras de fruto de chile independientemente del contacto o no con el picudo de chile (Figura 6e).

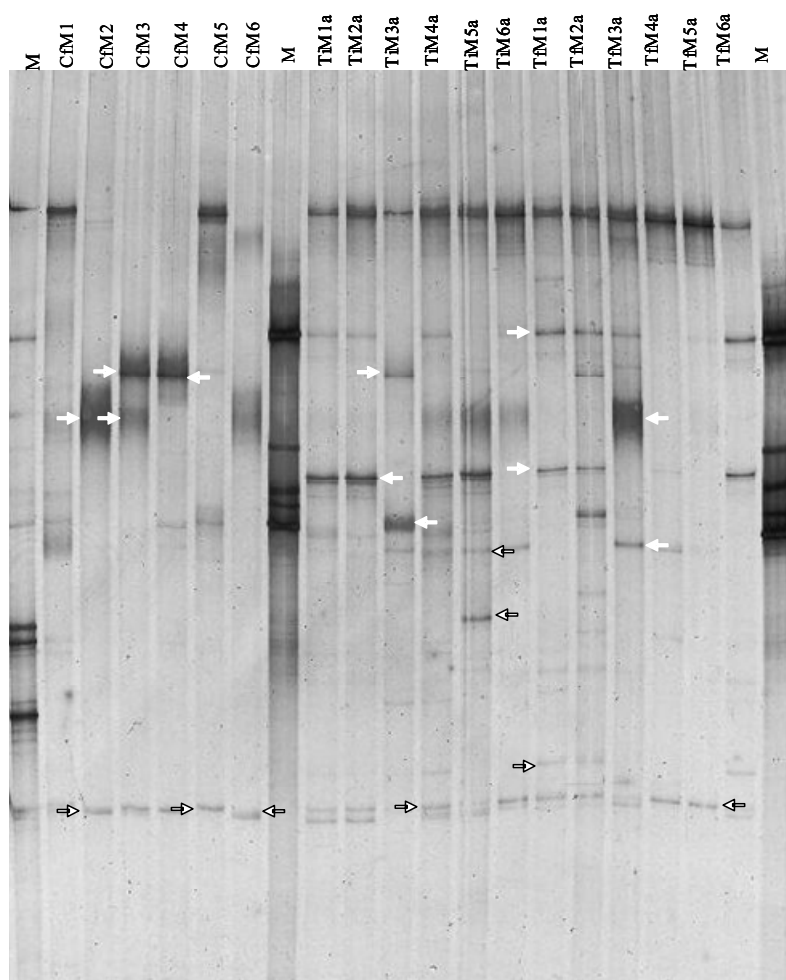


Figura 6e. Fotografía de MDE-gel de poliacrilamida a 0.625X (SSCP) de las muestras cultivo dependiente de frutos de chile expuestos de forma controlada al picudo de chile. Los carriles indican marcador estándar (M), tratamiento 48 h (Ti), tratamiento después 48 h (Tf), control final (Cf) y números seriales que indican a las muestras. Las flechas señalan aquellas bandas que fueron reamplificadas y secuenciadas.

Una vez realizada la selección de Unidades Taxonómicas Operacionales fueron cortadas y reamplificadas tal como se describe en la metodología. La relación de bandas y su interpretación se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Identificación parcial de las Unidades Taxonómicas Operacionales obtenidas de muestras del insecto *A. eugenii* Cano y Frutos de Chile de diferentes localidades.

Origen	Acceso GenBank	Bacteria	Identidad
Picudo de Chile			
OTU P2M1a		OTU no identificado	
OTU P2M1b	EF600986.1	Serratia Sp.	99%
OTUP2M1c		OTU no identificado	
OTU P2M1d	EF061516.1	Bacillus pumilus	100%
OTU P2M1e		OTU no identificado	
OTU P2M1f	EU693527.1	Enterobacter sakazakii	98%
OTU P2M3		OTU no identificado	
OTU P2S2a	EU427082.1	Uncultured bacterium	91%
OTU P2S2b		OTU no identificado	
OTU P2S2c		OTU no identificado	
OTU P2S4	EU427102.1	OTU no identificado	93%
OTU P2S6a	AB364963.1	Bacillus subtilis	100%
		Uncultured	
OTU P2S6b	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
Fruto Chile Colecta Carrizal			
OTU CH2S6	EU741039.1	Paenibacillus sp.	99%
		Uncultured	
OTU CH2S4	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
OTU CH2M3	EF528317.1	Bacterium 512	99%
OTU CH2M5	AB326719.1	Uncultured bacterium	98%
OTU CH2M6	DQ514672.1	Bacillus sp.	99%
Fruto Chile Colecta Cd. Constitución			
OTU CH3S1	EF528317.1	Bacterium 512	100%
		Uncultured	
OTU CH3S2	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
		Uncultured	
OTU CH3S3	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
OTU CH3S5	EF600986.1	Serratia sp.	99%
OTU CH3S6a	EF670574.1	Uncultured bacterium	96%
OTU CH3S6b	EU364832.1	Pantoea sp.	99%
OTU CH3S6c	EU705087.1	Uncultured	99%

OTU CH3M2a	EU467991.1	Pseudomonas sp.	
OTU CH3M2b		Uncultured bacterium	99%
OTU CH3M2c	EF528320.1	OTU no identificado	
OTU CH3M2d		Pantoea sp.	98%
OTU CH3M2e		OTU no identificado	
OTU CH3M2f	EU048334.1	OTU no identificado	
OTU CH3M3a	EF528317.1	Erwinia sp.	98%
		Bacterium 512	99%
		Uncultured	
OTU CH3M3b	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
OTU CH3M3c	EF471903.1	Pseudomonas sp.	95%
OTU CH3M4		OTU no identificado	
OTU CH3M5		OTU no identificado	
OTU CH3M6a	EF442065.1	Klebsiella sp.	100%
OTU CH3M6b	EF600986.1	Serratia sp.	99%

Fruto Chile Exposición Controlada

OTU Ti1a	EF528317.1	Bacterium 512	99%
OTU Ti1b	EU770697.1	Lactococcus sp.	99%
		Uncultured	
OTU Ti1c	EU629520.1	Streptococcus sp.	86%
OTU Ti2a	EF528317.1	Bacterium 512	99%
OTU Ti5a1		OTU no identificado	
OTU Ti5a2	EU240975.1	Bacillus cereus	99%
		Uncultured	
OTU Ti6a	EF679192.1	Enterobacter sp.	98%
OTU Tf1a1	EF600986.1	Serratia sp.	99%
OTU Tf1a2	AM075680.1	Uncultured bacterium	98%
OTU Tf4a		OTU no identificado	
OTU Tf6a1	DQ068906.1	Uncultured bacterium	94%
OTU Tf6a2	EF600986.1	Serratia sp.	99%
OTU Tf6a3		OTU no identificado	
OTU Ci1a		OTU no identificado	
OTU Ci1b		OTU no identificado	
		Uncultured	
OTU Ci3a	EU629356.1	Pseudomonas sp.	99%
OTU Ci3b	EF471903.1	Pseudomonas sp.	95%
OTU Ci4	EU014682.1	Salmonella bongori	99%
OTU Ci5	EU770634.1	Uncultured bacterium	99%
OTU Ci6a	EF612326.1	Paenibacillus sp.	93%
OTU Ci6b		OTU no identificado	
OTU Ci6c	EU302833.1	Salmonella sp.	98%
OTU Ci6d		OTU no identificado	
OTU Cf1		OTU no identificado	
OTU Cf3	EU302833.1	Salmonella sp.	98%
OTU Cf4	EU302833.1	Salmonella sp.	97%
OTU CfM2	AY191856.1	Ralstonia sp.	91%
OTU CfM3a		OTU no identificado	
OTU CfM3b	EF472537.1	Enterobacter pulveris	99%

OTU CfM3c		OTU no identificado	
OTU CfM4	EU302833.1	Salmonella sp.	98%
OTU CfM5		OTU no identificado	
OTU CfM6	EU770634.1	Uncultured bacterium	99%
OTU TiM2a		OTU no identificado	
OTU TiM3a1	AY191849.1	Ralstonia sp.	91%
OTU TiM3a2	EU784954.1	Pseudomonas sp.	98%
OTU TiM4a		OTU no identificado	
OTU TiM6a1	EU706276.1	Uncultured Ralstonia	99%
OTU TiM6a2	EU400647.1	Bacillus cereus	85%
OTU TfM1a1	AY191853.1	Ralstonia sp.	93%
OTU TfM1a2	EU730922.1	Ralstonia pickettii	94%
OTU TfM1a3	EU723886.1	Bacterium PSFeM	99%
OTU TfM4a1	EU705953.1	Uncultured Ralstonia	88%
OTU TfM4a2		OTU no identificado	
		Pseudoburkholderia	
OTU TfM6a	DQ490985.1	malthae	88%

A las muestras que se incidieron de los perfiles bacterianos obtenidos en los geles de MDA-poliacrilamida que fueron amplificadas y secuenciadas se les hizo el alineamiento y análisis como se indica en la metodología y se obtuvo la relación filogenética (Figura 7).

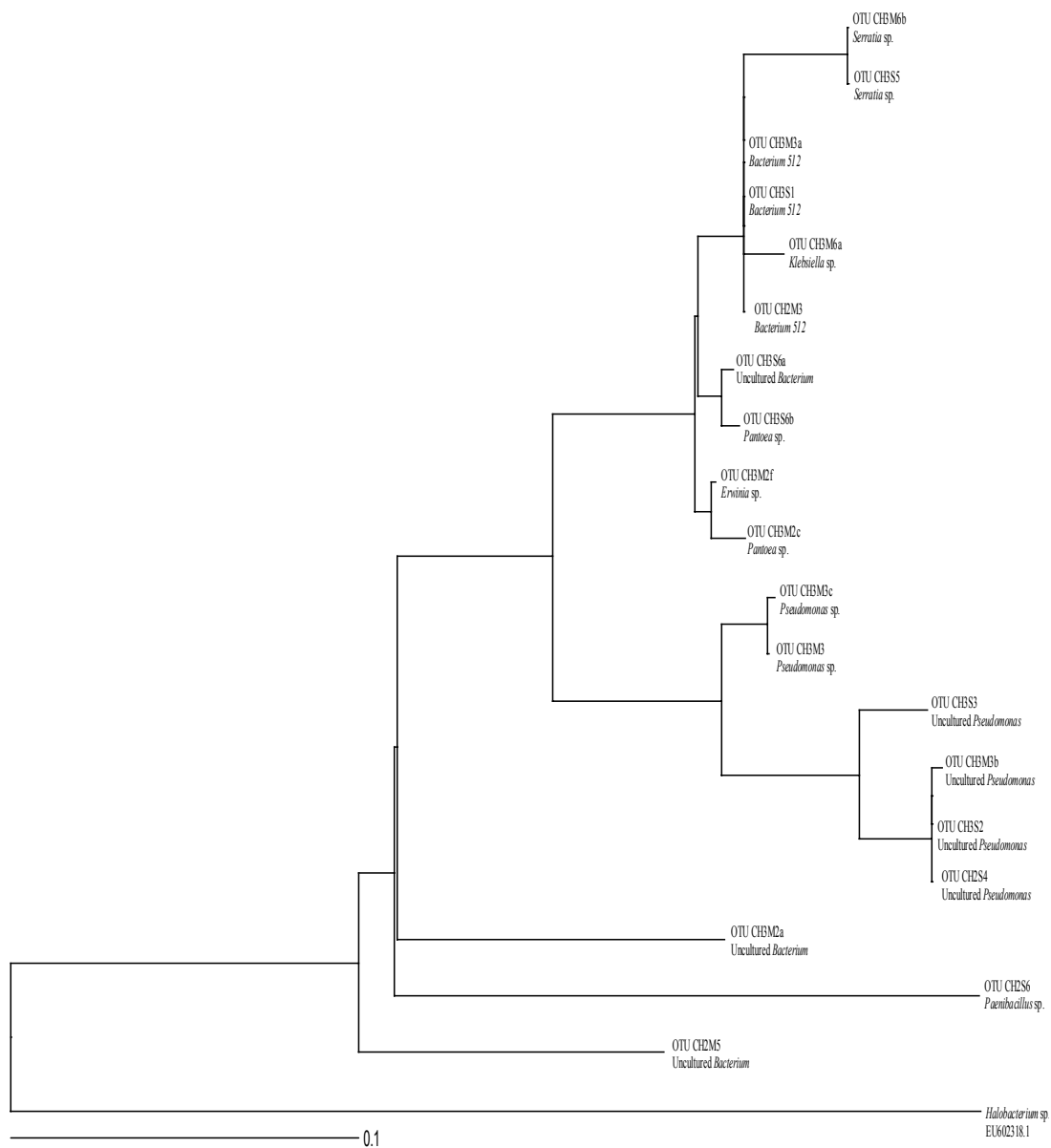


Figura 7a. Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones de un fragmento de 400 pb de la subunidad ribosomal 16S que muestra la relación filogenética de aislamientos bacterianos a partir de frutos de chile de campos agrícolas.

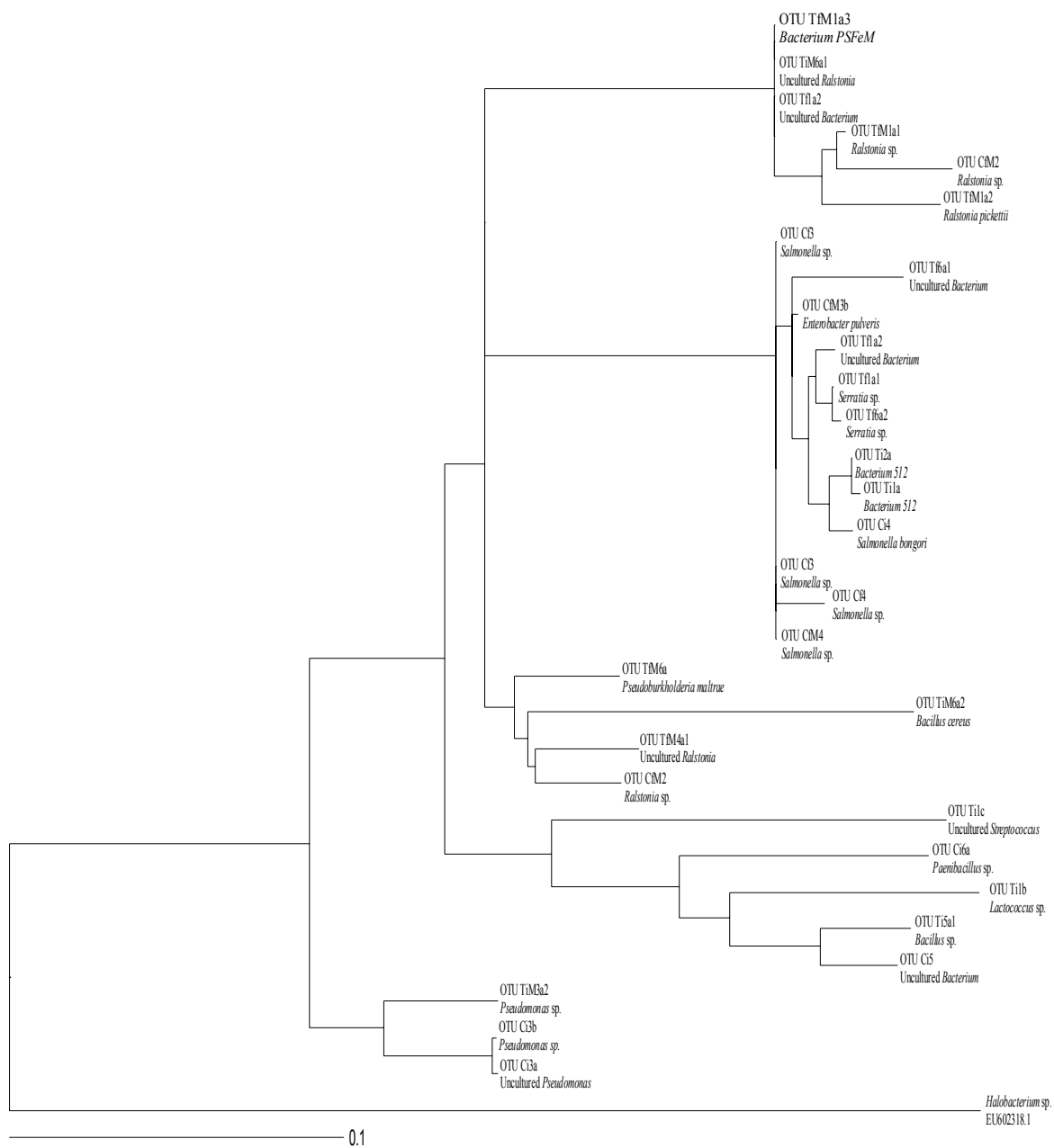


Figura 7b. Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones de un fragmento de 400 pb de la subunidad ribosomal 16S que muestra la relación filogenética de aislamientos bacterianos a partir de frutos de Chile expuestos al insecto plaga de forma controlada.

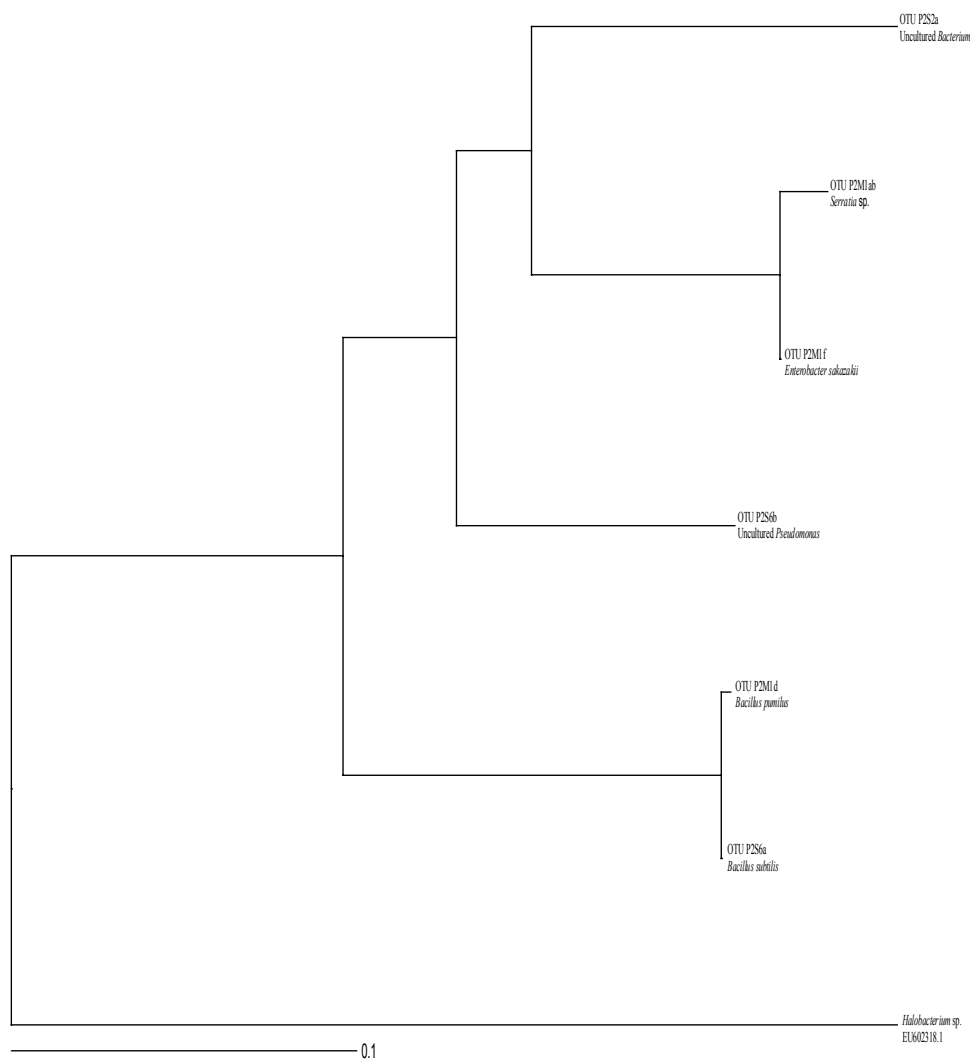


Figura 7c. Árbol de homología de las secuencias de nucleótidos obtenidas de las amplificaciones de un fragmento de 400 pb de la subunidad ribosomal 16S que muestra la relación filogenética de aislamientos bacterianos a partir del insecto picudo de Chile.

Los MDE-geles de poliacrilamida a 0.625X obtenido fueron capturados en una base de datos del programa GelCompar II V 4.602 donde manualmente se seleccionaron las Unidades Taxonomicas Operacionales (OTUs) presentes para el análisis de agrupamiento.(Figura 8).

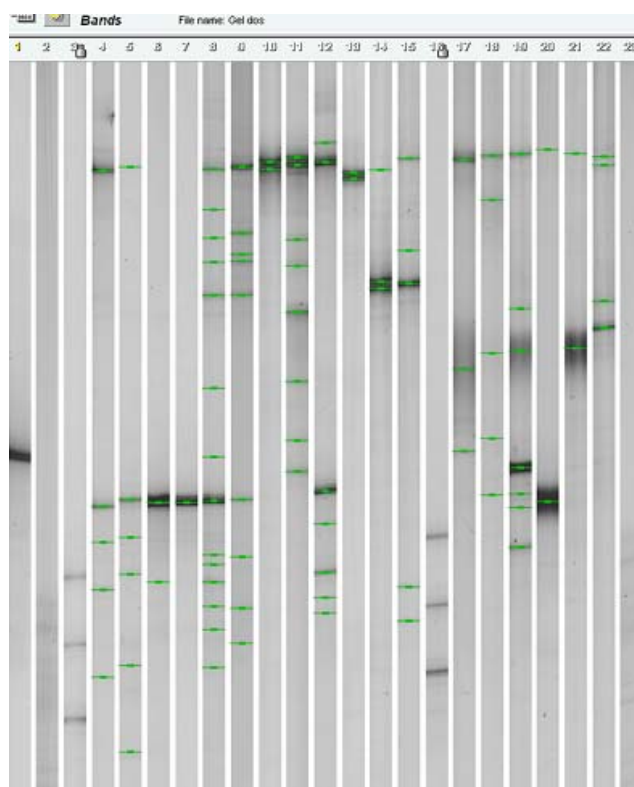


Figura 8. Localización de bandas (OTUs) analizadas a partir de la técnica SSCP utilizando el programa GelCompar II V 4.602. Los puntos indican la posición de las bandas identificadas.

Se realizó el análisis de agrupamiento (clusters) de las muestras aisladas del picudo de Chile recolectadas en el Carrizal (P1) y Cd. Constitución (P2) a partir de los patrones de bandas detectados en el análisis de SSCP.

En las muestras de bacterias aisladas en caldo TSB (Figura 9) se observa que las comunidades bacterianas correspondientes al primer muestreo en el Carrizal son

heterogéneas entre si y las correspondientes al segundo muestreo en Cd. Constitución son más coherentes. Todas las muestras de Cd. Constitución (P2M1-P2M6) fueron similares en al menos un 65% y hubo casos como entre P2M3-P2M4 y P2M5-P2M6 que fueron agrupadas hasta en un 97.9% y 98.8% respectivamente.

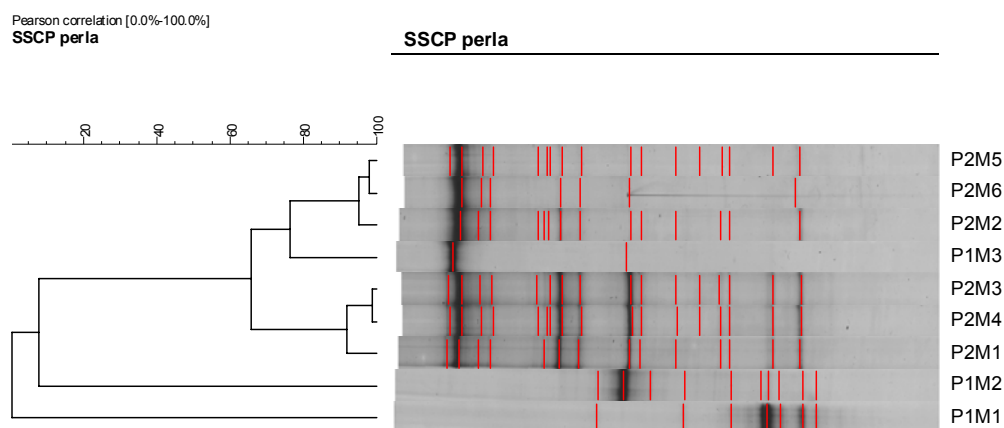


Figura 9. Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de bacterias aisladas en medio de cultivo de la superficie del picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles señalan primer muestreo (P1), segundo muestreo (P2), la letra M números seriales que indican a la muestra de bacterias cultivables.

Las muestras de picudo de Chile recolectadas en Cd. Constitución tanto de bacterias aisladas en cultivo como las de extracto de ADN bacteriano presentan una similitud del 25%. Se tiene un agrupamiento del 91% entre la muestra cultivable P1M2 recolectada en el Carrizal y la muestra de extracto de ADN bacteriano P2S1 obtenida en Cd. Constitución así mismo el 71% entre muestras cultivo dependiente del Carrizal P1M3 y Cd. Constitución P2M2-P2M5-P2M6. El total de las muestras presenta un 15% de homología (Figura 10).

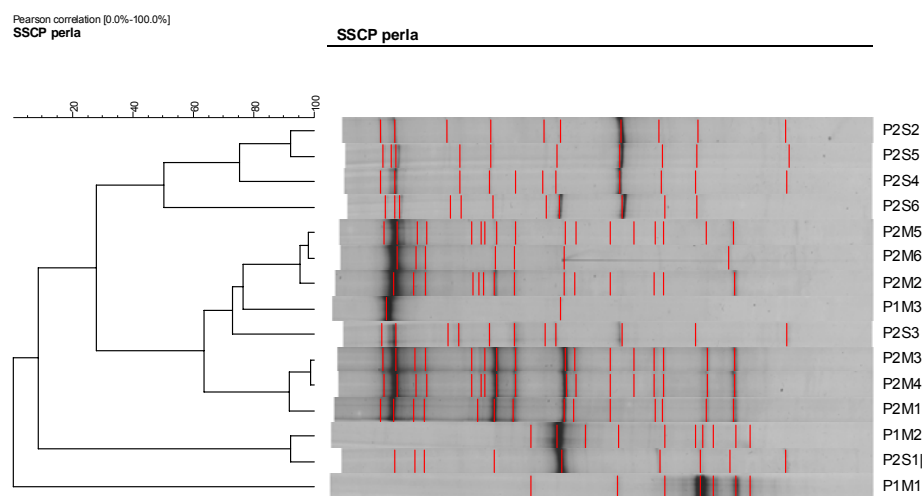


Figura 10. Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de extracto de ADN bacteriano y las bacterias aisladas en cultivo obtenidas de la superficie del picudo de chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles señalan primer muestreo (P1), segundo muestreo (P2), la letra M y S con números seriales que indican a la muestra cultivable y la de extracto de ADN respectivamente.

El análisis de agrupamiento de los patrones de bandas de las muestras obtenidas en la exposición controlada de fruto de chile al picudo de chile en el campo experimental del CIBNOR nos indica que de las 6 replicas del control inicial al menos 3 de ellas son similares en un 45% entre ellas y Ci2-Ci6 son 25% con respecto a las anteriores. Las replicas de los controles finales se agruparon en pares con diferentes porcentajes de similitud que van desde 89% en Cf4-Cf3 hasta un 5% Cf1-Cf5 lo cual indica menos coherencia en el total de las muestras (Figura 11).

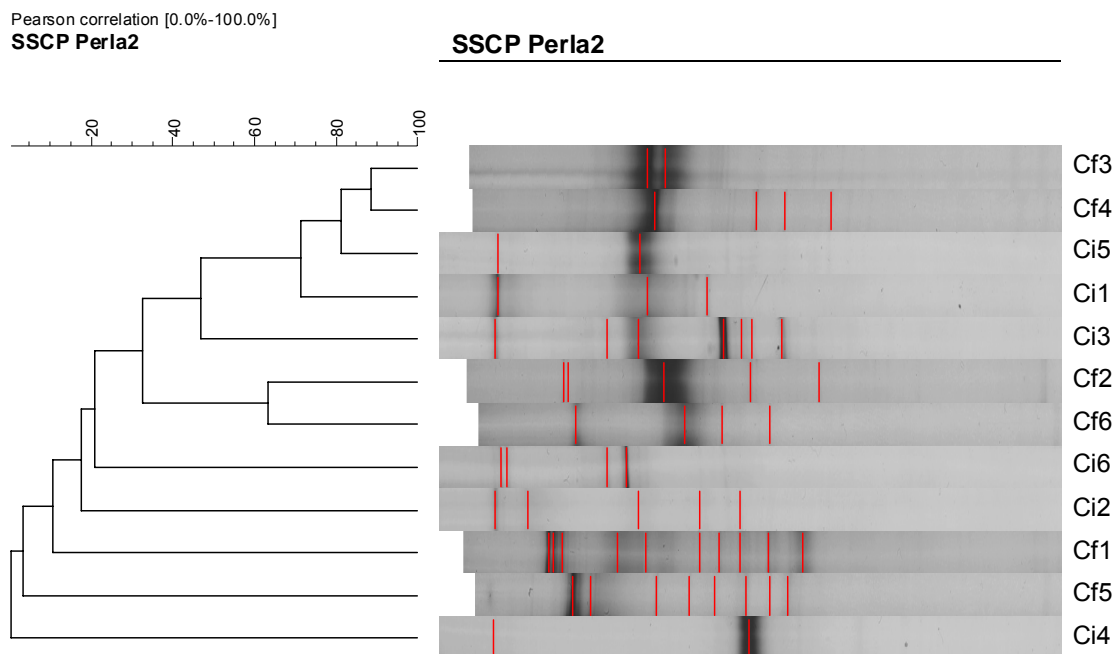


Figura 11. Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras control obtenidas en la exposición controlada de frutos de chile al picudo de chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control inicial (Ci) y control final (Cf) y números seriales que señalan a la muestra de extracto de ADN bacteriano.

El análisis de agrupamiento de las muestras obtenidas de fruto de chile después de 48 h de exposición a los picudos de chile muestras dos grupos, uno con similitud del 50% entre 5 de 6 muestras y otro representativo del control inicial con el 30% en 5 de 6 muestras. Las muestras Ci4 y Ti3a son similares entre ellas 72.1% y se agruparon con 14.7% a las muestras tratadas aunque se observa claramente que la similitud entre las muestras control inicial y las expuestas al picudo de chile por 48 h es mínima con aproximadamente 8% (Figura 12).

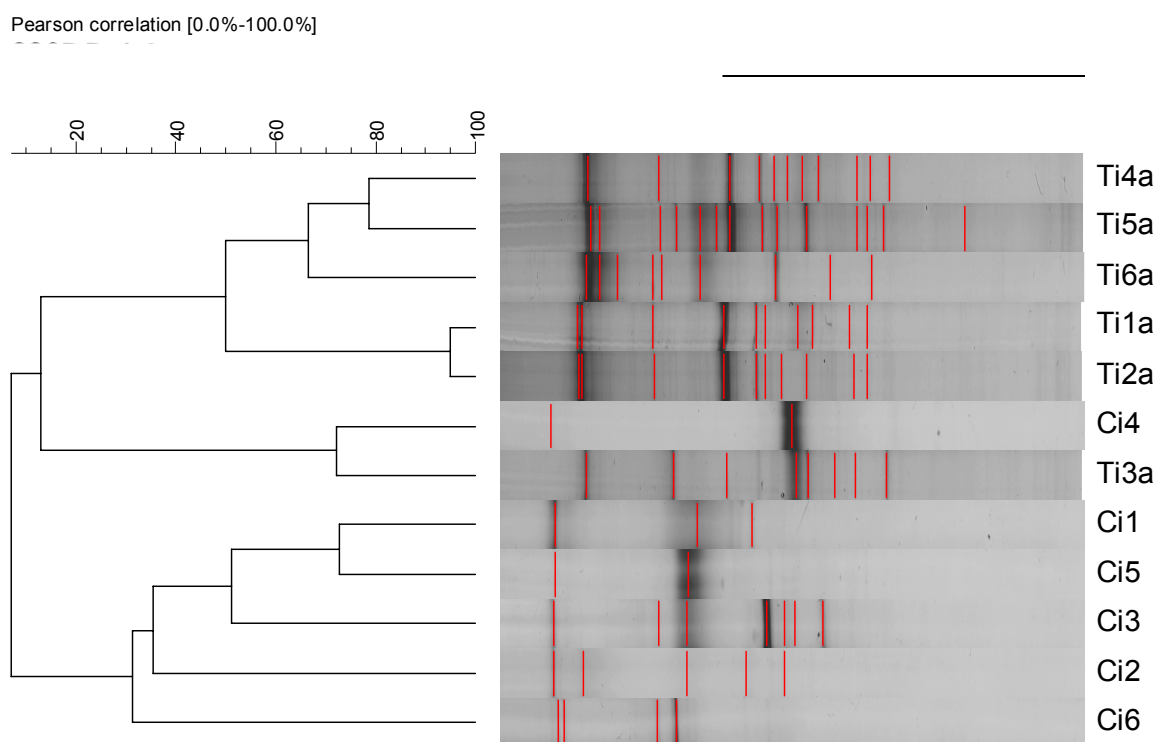


Figura. 12. Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de fruto de chile a las 48 h de exposición controlada al picudo de chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control inicial (Ci) y Ti (Tratamiento a 48 h) y números seriales que señalan a las muestras de extracto de ADN bacteriano.

En el análisis de agrupamiento para las muestras después de 48 h de exposición al insecto se integran claramente dos grupos bien definidos el primero con un porcentaje de 37.9% de similitud en el cual se encuentran 4 de los controles y el segundo agrupamiento que integra a 5 de las muestras tratadas con el 41% de similitud. El patrón de OTUs en el total de las muestras conserva un 15% de similitud. En este análisis únicamente la muestra Cf5 es heterogénea y diferente al resto de las muestras con un 5%de aproximación (Figura 13).

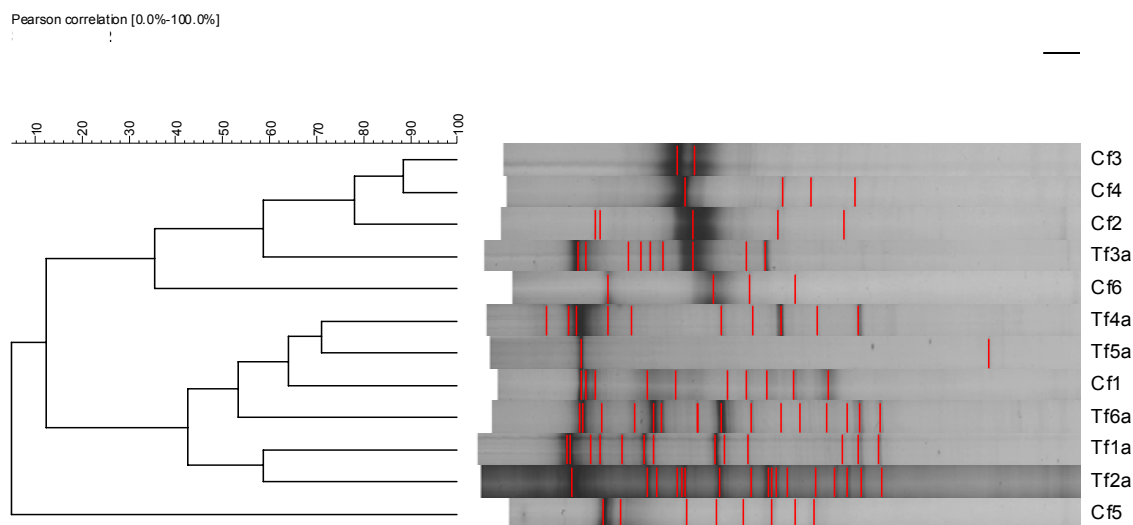


Figura. 13. Patrones de bandas detectados en SSCP agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) de las muestras de fruto de Chile después de las 48 h de exposición controlada al picudo de Chile, asumiendo que cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control final (Cf) y Tf (Tratamiento después 48 h) y números seriales que señalan a las muestra de extracto de ADN bacteriano.

En la comparación de similitud hecha para las muestras de los frutos que tuvieron contacto con *A. eugenii* a las 48 h y después de las 48 h los perfiles bacterianos se agruparon en dos, el primero con un porcentaje de 41% que integra a 5 de las 6 muestras después de las 48 h y el segundo con el 44% que agrupa a 5 de las muestras a 48 h ambos tipos de muestras tienen un 30 % de similitud y solo Tf3a sale de los grupos pero conserva un 19% de similitud (Figura 14).

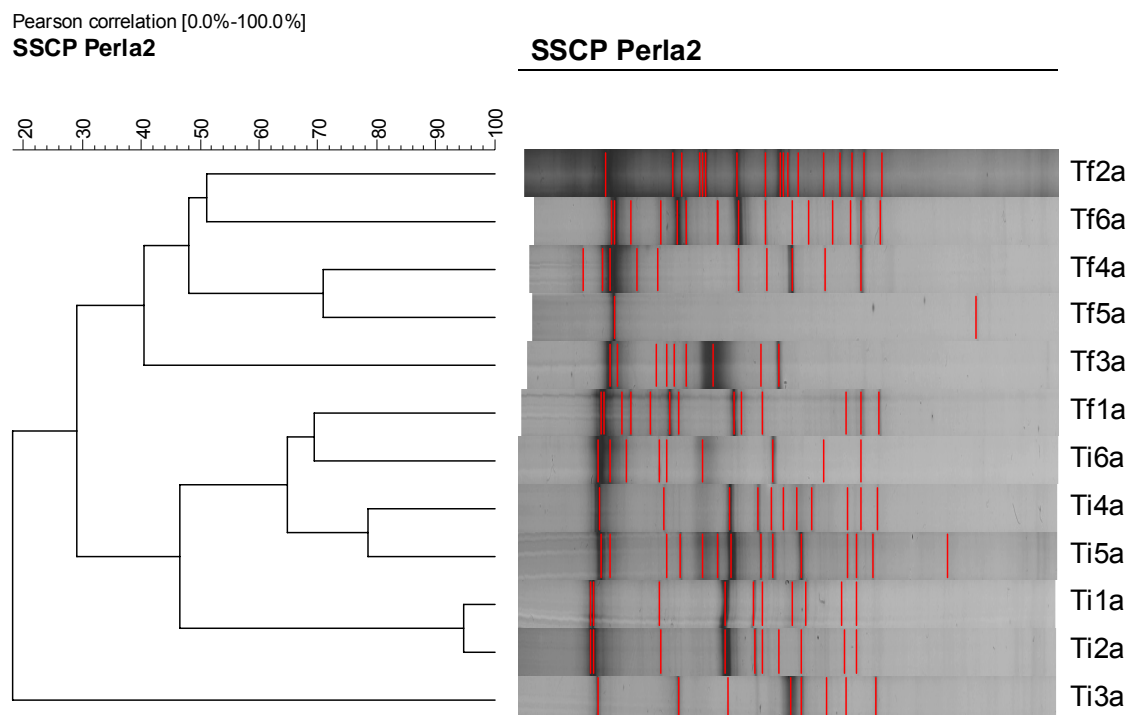


Figura. 14. Perfiles bacterianos de las muestras de fruto expuestos de manera controlada al picudo de chile agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican tratamiento a 48h (Ti) después 48h (Tf) y números seriales que señalan a las muestra de extracto de ADN bacteriano.

En los perfiles bacterianos cultivo dependientes de las muestras de fruto expuesto a *A. eugenii* podemos observar claramente que el 66% de las muestras expuestas 48 h y después de 48 h tienen un 75% y 65% de similitud respectivamente entre cada una de ellas integrando así dos grupos. Ambos agrupamientos tiene una similitud del 50% de igualdad que comparadas con las muestras control solo se están relacionando con este el 12%, además de que se ve en este caso que las muestras control tienen una pobre diversidad bacteriana y heterogéneas entre si (Figura 15).

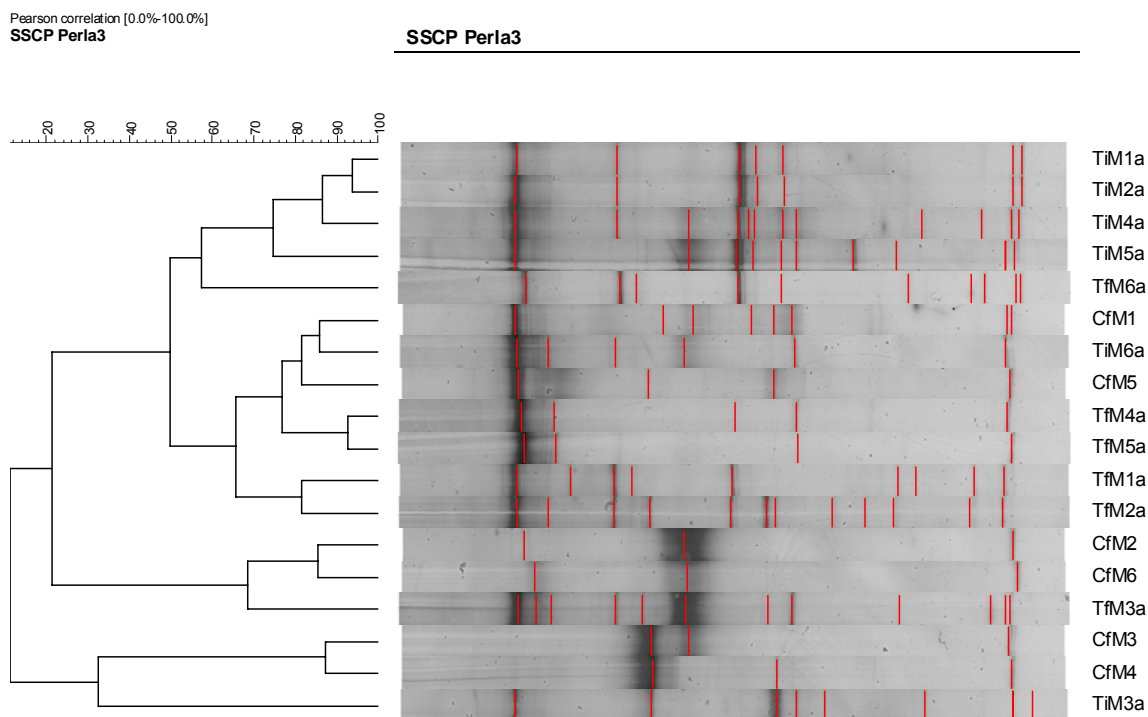


Figura. 15. Perfiles bacterianos de las muestras de fruto expuestos de manera controlada al picudo de chile y enriquecidas en caldo TSB agrupadas en el programa GelCompar II (clusters) cada banda representa una OTU y su intensidad es indicador de la abundancia relativa. Los carriles indican control final (Cf) tratamiento a 48h (Ti) después 48h (Tf) y la letra M con números seriales que señalan a las muestras de bacterias aisladas en caldo de cultivo TSB.

7.3 Cría de insectos.

Debido a que el manejo del picudo de chile presenta dificultades, es importante mantener colonias de insectos libres de presión de selección para poder establecer patrones de referencias con respecto a las poblaciones de campo.

7.3.1 Mantenimiento y propagación

El picudo de chile adulto tuvo un porcentaje de supervivencia del 91.4% en condiciones controladas a una T optima de 22-25 °C sin fotoperiodo; alimentado con chile ancho y/o jalapeño en trozos y entero libre de pesticidas.

Con las observaciones preeliminares se determino que la oviposición en frutos inmaduros de 3 cm \pm 2 es efectiva obteniendo un total de 262 huevecillos con 4 huevecillos/chile y la media del tiempo de eclosión fue de 16 días. (Tabla V).

Tabla V. Registro preeliminar de la oviposición controlada de picudo de chile en el laboratorio.

Tiempo exposición (h)	No. chiles	No. de huevecillos	Tiempo de eclosión huevecillo – adulto (días)
48	5	17	15
48	5	20	16
48	7	20	17
48	7	25	15
48	8	48	16
48	8	22	15
48	9	29	15
48	9	21	16
48	10	22	17
48	10	38	16

Basados en los datos anteriores se realizó un total de 7 oviposiciones en frutos inmaduros. El intervalo de tiempo de eclosión de adultos que se obtuvo fue de 15 a 28 días (Figura 16) la media fue de 15 días, de esta manera se obtuvo una primera generación de insectos después de una oviposición de 48 h a las condiciones preestablecidas.

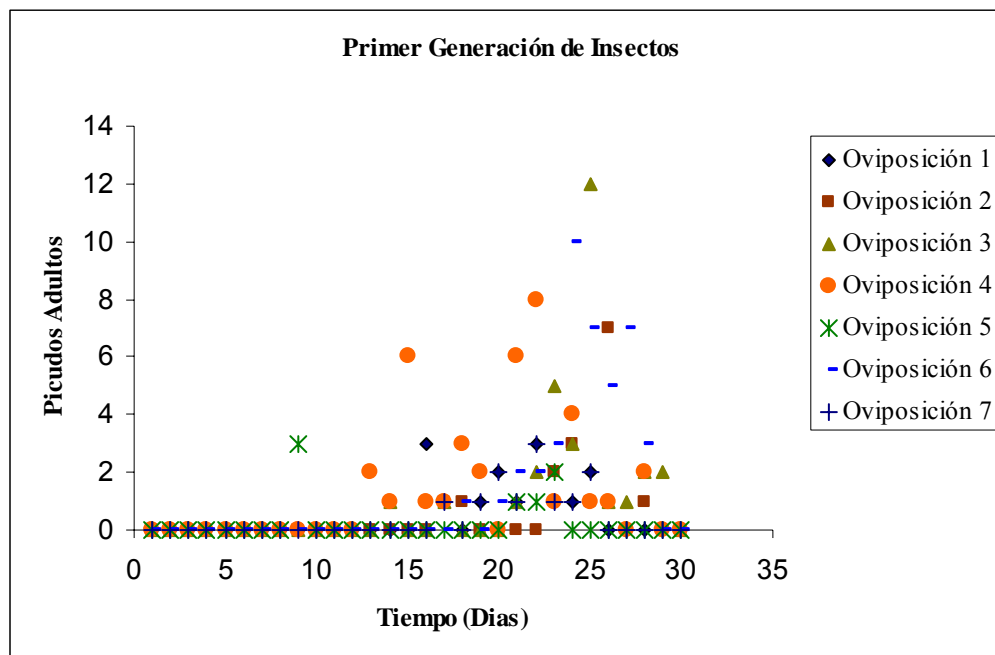


Figura 16. Distribución de los picudos de chile al momento de emerger de los chiles ovipositados en condiciones de laboratorio a una temperatura de 22-25 °C sin fotoperíodo.

De acuerdo a las observaciones en el estereoscopio no se presentó ninguna alteración o cambio morfológico en la ontogenia de la primera generación de insectos en el laboratorio.

Los huevecillos son usualmente oblongo-ovalados pero pueden adoptar la forma de la cavidad donde se localicen. La superficie es lisa, brillante, flexible y resistente, al inicio de color aperlado tornándose amarillo después.

Las larvas recién eclosionadas miden entre 0.8 a 0.5 mm de longitud y 1 mm de media. Las larvas son grandes con cabeza color blanquecino con punta de negro, mandíbula marrón. (Elmore, et al., 1934).

Las pupas mudan su piel y sufre cambios en su apariencia, los ojos comienzan a mostrar un tinte amarillo pocas horas después de formarse la pupa. En 2 a 3 días, oscurecen los ojos, el pico se convierte en una luz de color amarillento pardo con una punta negra, y partes de las antenas y aletas adquieren un color gris.

Los adultos recién desarrollados son de color marrón claro, transcurren 3 a 4 h antes de que los adultos desarrollados emerjan del fruto o yema. Cuando el adulto de picudo de chile emerge corta un agujero limpio en el fruto o yema e inmediatamente se alimenta de frutos inmaduros (Figura 17).

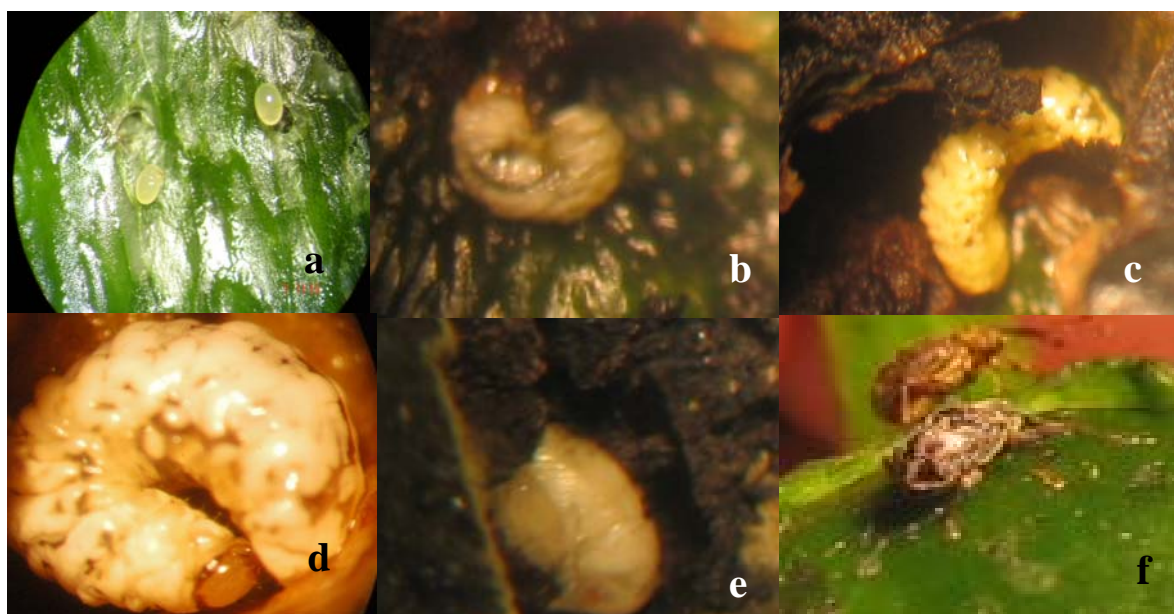


Figura 17. Ciclo de vida del *A. eugenii* Cano obtenido en condiciones de laboratorio. a) Huevecillos, b) Larva 1, c) Larva 2, d) Larva 3, e) Pupa y f) Adulto.

En el análisis de la morfología del picudo de chile en sus diferentes estadios por microscopia electrónica de barrido nos permitió observa la ultra estructura de los ejemplares donde se pude ver claramente la integridad de estos y además estructuras mas detalladas como la mandíbula (Figura 18).

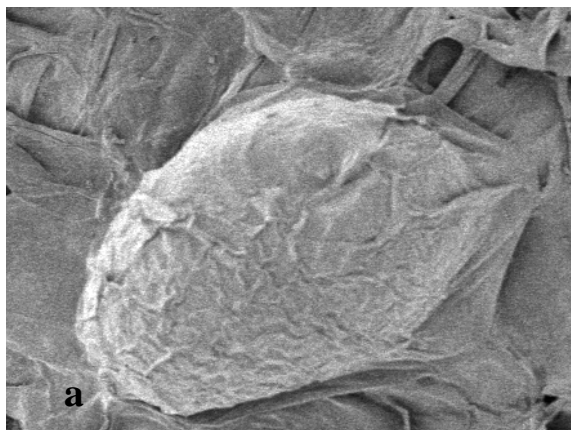


Figura 18a. Ultra estructura del Picudo de chile en estadio huevecillo, este ejemplar emergió en condiciones de laboratorio y fue visualizado en microscopio electrónico de barrido a 200 μM , 10.0 kV.

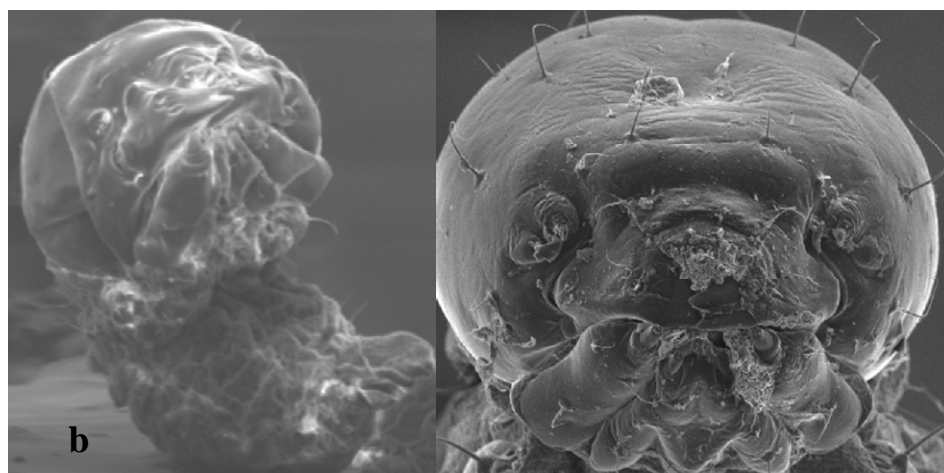


Figura 18b. Ultra estructura del Picudo de chile en estadio larva y su mandíbula, este ejemplar emergió en condiciones de laboratorio y fue visualizado en microscopio electrónico de barrido a 200 μM , 10.0 kV.

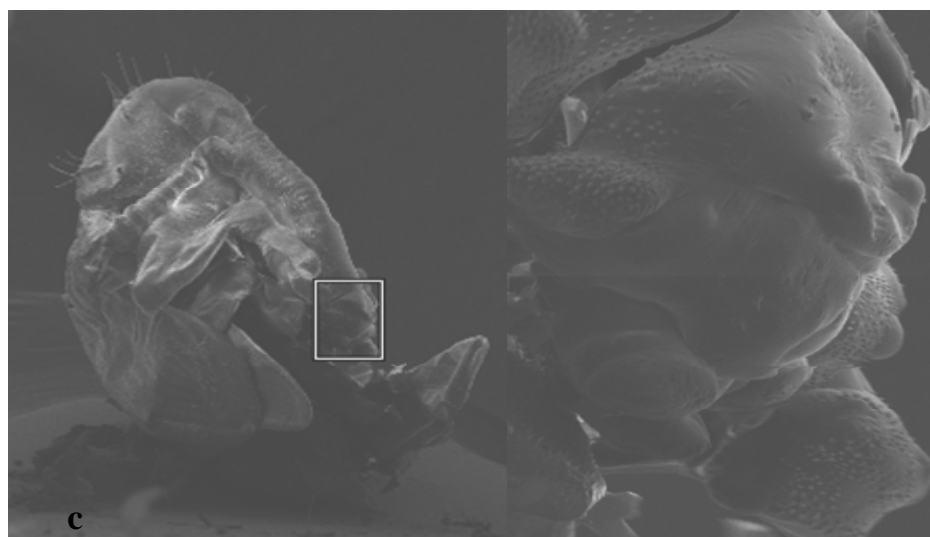


Figura 18c. Ultra estructura del Picudo de Chile en estadio Pupa y su mandíbula, este ejemplar emergió en condiciones de laboratorio y fue visualizado en microscopio electrónico de barrido a 200 μM , 10.0 kV.



Figura 18d. Ultra estructura del Picudo de Chile adulto y su mandíbula, este ejemplar emergió en condiciones de laboratorio y fue visualizado en microscopio electrónico de barrido a 200 μM , 10.0 kV.

7.3.3 Análisis de actividad enzimática

En el presente trabajo se ha determinado la actividad de 19 enzimas hidrolíticas en homogenizados de cada estadio del insecto picudo de Chile, estas enzimas incluidas en el kit APY ZYM (Tabla VI) las cuales pertenecen a cinco grupos. La prueba estadística de Friedman acusó diferencias significativas en las actividades enzimáticas hidrolíticas entre los estadios ($df=18$, $p<0.05$) mostrando valores más altos el estadio Larva 1.

Tabla VI. Actividad Enzimática utilizando el API ZYM (U substrato hidrolizado en nM mg⁻¹ de proteína) detectada en homogenizados de huevecillo, larva 1, larva 2, larva 3, pupa y adulto de *Anthonomus eugenii* Cano. Los valores mostrados son las medias (\pm DS) de 3 replicas.

Enzima	Huevecillos	Larva 1	Larva 2	Larva 3	Pupa	Adulto
<i>Fosfatasas</i>						
<i>Fosfatasa alcalina</i>	61.9 \pm 9.7	109 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa</i>	67.5 \pm 0.0	99.9 \pm 15.7	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>Fosfatasa acida</i>	61.9 \pm 9.7	109 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	38.5 \pm 6.1
<i>Esterasas</i>						
<i>Esterasa (C 4)</i>	67.5 \pm 0	81.7 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>Lipasas</i>						
<i>Esterasa Lipasa (C 8)</i>	50.6 \pm 0.0	54.5 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	35.5 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>Lipasa (C 14)</i>	8.4 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	8.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	11.8 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0
<i>Proteasas</i>						
<i>Leucina arilamidasa</i>	67.5 \pm 0.0	109 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	51.8 \pm 8.2	47.3 \pm 0.0	38.5 \pm 6.1
<i>Valina arilamidasa</i>	16.9 \pm 0.0	36.3 \pm 15.7	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	35.5 \pm 0.0	10.5 \pm 0.0
<i>Cistina arilamidasa</i>	11.2 \pm 4.9	13.6 \pm 0.0	8.3 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	23.7 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0
<i>Tripsina</i>	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	16.5 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0
<i>α-quimiotripsina</i>	8.4 \pm 0.0	109 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	0.0 \pm 0.0	5.2 \pm 0.0
<i>Glucosidasas</i>						
<i>α-galactosidasa</i>	16.9 \pm 0.0	27.2 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	5.9 \pm 0.0	10.5 \pm 0.0
<i>β-galactosidasa</i>	67.5 \pm 0.0	109 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>β-glucuronidasa</i>	50.6 \pm 0.0	81.7 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>α-glucosidasa</i>	33.7 \pm 0.0	81.7 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	51.8 \pm 0.0	35.5 \pm 0.0	21.0 \pm 0.0
<i>β-glucosidasa</i>	50.6 \pm 0.0	54.5 \pm 0.0	66.1 \pm 0.0	56.5 \pm 0.0	35.5 \pm 0.0	21.0 \pm 0.0
<i>N-acetil-β-glucosaminidasa</i>	67.5 \pm 0.0	109 \pm 0.0	60.6 \pm 9.5	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	42.0 \pm 0.0
<i>α-manosidasa</i>	50.6 \pm 0.0	54.5 \pm 0.0	60.6 \pm 9.5	56.5 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	31.5 \pm 0.0
<i>α-fucosidasa</i>	39.4 \pm 9.7	90.8 \pm 15.7	66.1 \pm 0.0	51.8 \pm 0.0	47.3 \pm 0.0	35.0 \pm 6.1

La sumatoria de las actividades enzimáticas de cada una de las enzimas hidrolíticas medidas nos permitió observar que la mayor actividad enzimática total se presentó en el estadio Larva 1 (Figura 19), tal como debía esperarse al ser este estadio el que mostrara los valores más altos en cada enzima. De los cinco grupos de enzimas evaluados dos grupos de enzima, las enzimas fosfatasas y glucosidasas se presentaron en todos los estadios (Figura 20a y b) y de las enzimas proteolíticas tripsina no muestra actividad en los estadios excepto en Larva 2 con niveles bajos, cistina arilamidasa y α -quimiotripsina no se detectaron en el estadio larva 3 y pupa respectivamente (Figura 20 c). La enzima lipasa no mostró actividad en los estadios Larva 1, Larva 3 (Figura 20 d) y finalmente la enzima esterasa C4 esta activa en todos los estadios del insecto presentándose en mayor intensidad en el estadio Larva 1.

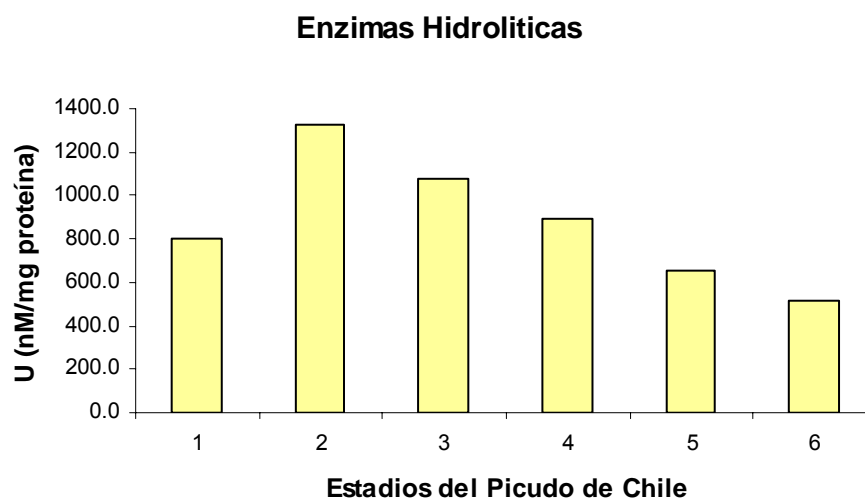


Figura 19. Actividad enzimática hidrolítica total presente en los diferentes estadios del *A. Eugeni*. 1) Huevecillo, 2) Larva 1, 3) Larva 2, 4) Larva 3, 5) Pupa, 6) Adulto.

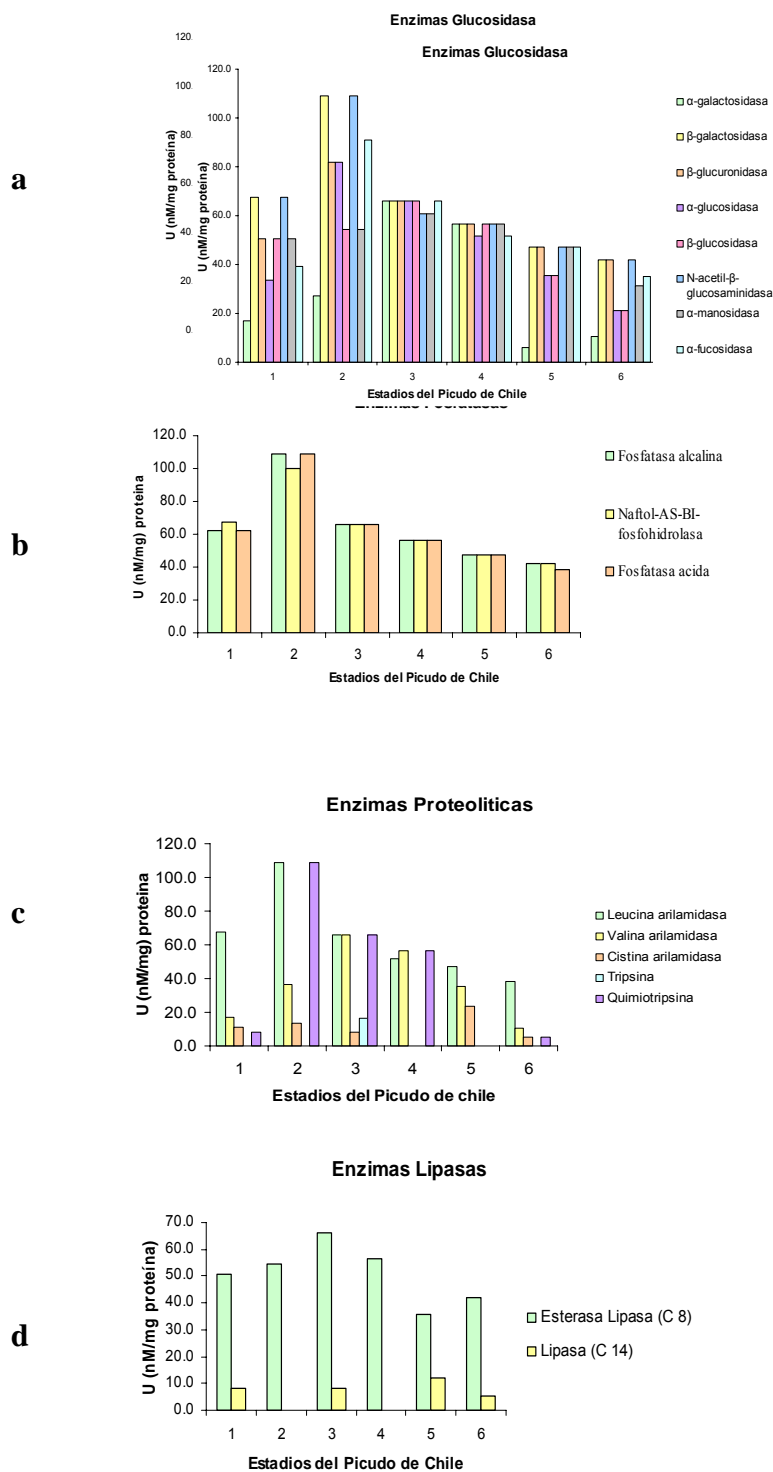


Figura 20. Actividad Enzimática en nM/mg proteína de las Enzimas Hidrolíticas presentes en los diferentes estadios del insecto (1. Huevecillo; 2. Larva 1; 3. Larva 2; 4. Larva3; 5. Pupa; 6. Adulto). a) Glucosidasas. b) Fosfatasas c) Proteasas y d) Lipasas.

7.4 Evaluación de actividad insecticida.

Los aislamientos bacterianos evaluados para el control del picudo de Chile en condiciones de laboratorio mostraron porcentajes de mortalidad muy bajos exceptuando la bacteria P116 aislada del insecto y Bac F315 aislada del fruto. No obstante el mejor de los tratamientos fue Bac F315 por presentar un porcentaje de mortalidad del 92% (Figura 21).

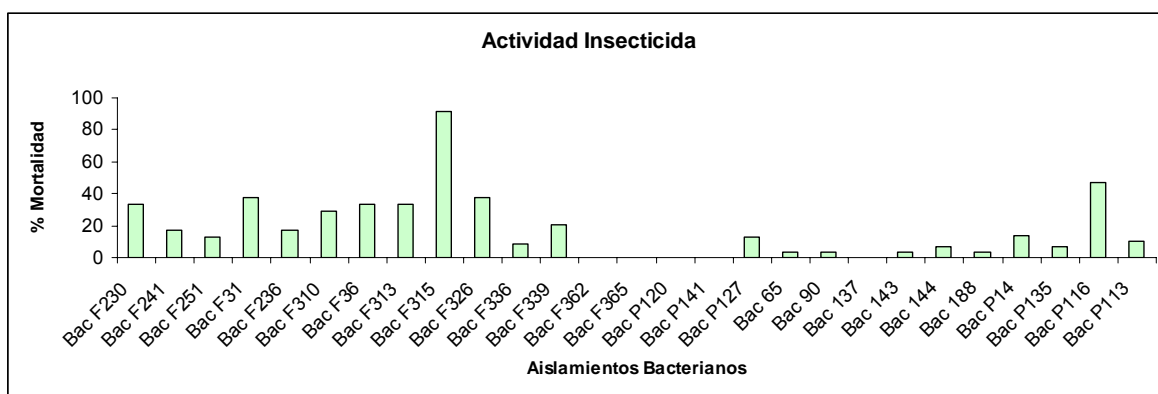


Figura 21. Porcentaje de mortalidad de los aislamientos bacterianos obtenidos tanto del insecto como de frutos de Chile.

Otro aislamiento de fruto Bac F188 mostró ser patógeno a este insecto por presentar modificaciones en las excretas del insecto. En las observaciones realizadas en el estereoscopio se vieron desechos más líquidos dejando sobre la superficie del Chile una consistencia acuosa que diferiría claramente del resto de las evaluaciones que presentaban excretas en puntos sólidas de color oscuro.

Las pruebas bioquímicas preliminares indicaron que las dos cepas que causaron mortalidad en el insecto pertenecen al género *Bacillus* sp y la que presentó un efecto patógeno se identificó como *Enterococcus* sp.

Mediante el análisis molecular las cepas del genero *Bacillus* que presentaron mortalidad, arrojaron un porcentaje de 100% de homología con el gen 16S RNA ribosomal de la cepa *Bacillus cereus* la del fruto de chile y *Bacillus* sp. la aislada del insecto. La cepa patógena tiene homologia del 99% con la secuencia parcial del gen 16S RNA ribosomal *Enterococcus faecium* (Tabla VII).

Tabla VII. Identificación parcial de las cepas bacterianas que mostraron efecto insecticida en *A. eugenii* Cano.

Origen	Actividad Insecticida	Acceso GenBank	Bacteria	Identidad
Fruto de chile	92 % Mortalidad	DQ884352.1	<i>Bacillus cereus</i> BAC-B2s	100%
	Patógena (Modificación en heces)	EU722747.1	<i>Enterococcus faecium</i>	99%
<i>A. eugenii</i>	47% Mortalidad	EU202686.1	<i>Bacillus</i> sp. AG4	100%

VIII. DISCUSIONES.

8.1 Aislamiento bacteriano.

Es importante resaltar que existe dificultad para cultivar microorganismos en condiciones de laboratorio pues no existe ningún medio adecuado para el crecimiento de toda la diversidad de bacterias, se conoce que entre el 0.1 y el 1% de las bacterias en un hábitat pueden ser cultivables por técnicas estándar (Amann *et al.*, 1995; Ovreås y Torsvik 1998; Suzuki *et al.*, 2005). En función de lo señalado por estos autores se utilizaron condiciones para aislar las bacterias mesófilas como candidatas a la búsqueda de su capacidad insecticida por ser las de mayor diversidad y presencia en el medio ambiente terrestre y por lo tanto en los cultivos de Chile así como en el insecto ya que la temperatura de 37 °C utilizada en el laboratorio para aislar a este grupo de bacterias cae en el rango de las temperaturas alcanzadas en los campos agrícolas.

Sin embargo el utilizar únicamente técnicas microbiológicas tradicionales no permite conocer realmente la diversidad bacteriana presente ya que se estima que conocemos un número muy pequeño de las especies existentes de microorganismos (Torsvik *et al.*, 1990) por lo que no se podía establecer si las cepas aisladas eran consecuencia de una asociación al fruto y al insecto o únicamente microorganismos de vida libre por lo tanto se decidió complementar este trabajo con la determinación de perfiles de comunidades bacterianas que finalmente nos indicó que el número de aislamientos obtenidos está relacionado con la riqueza bacteriana presente en el cultivo de Chile, pero además se observó la diversidad bacteriana no cultivable a las condiciones preestablecidas en el laboratorio (Palleroni 1997; Aman *et al.* 1995; Tebbe *et al.*, 2001).

8.2 Diversidad microbiana.

No existen reportes previos de la diversidad bacteriana en insectos del orden Coleoptera, aunque hay un estudio de comunidades bacterias en tracto digestivo de abejas (Apoidea) por Mohr y Tebbe en 2006, ellos encuentran bacterias de las Familias *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae*. Los análisis filogenéticos de este trabajo, basados en la secuencia del gen 16S ADNr nos muestran que la diversidad microbiana del picudo de Chile está representada por las Familias *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae* principalmente; esto nos permite establecer que los insectos independientemente de su orden no presentan una diferencia completa en sus comunidades bacterianas.

Como se señala en resultados se logró identificar tres OTU's que soportan una similitud del 15% para toda la diversidad microbiana del picudo de Chile lo cual nos permite establecer que el insecto tiene una asociación de al menos tres filotipos de bacterias altamente abundantes, dos de los cuales no lograron identificarse pero el último pertenece al género *Bacillus*, esto es comparable con lo descrito por Rada *et al.*, en 1997 y los autores Mohr y Tebbe en 2006. Por lo que el insecto picudo de Chile tiene bacterias asociadas independientes de la ubicación geográfica del insecto y la localización de la dieta.

Sin embargo los resultados reflejan que el resto de la diversidad bacteriana del picudo de Chile es heterogénea y dependiente del hábitat del insecto.

De acuerdo a los análisis de la diversidad microbiana de la superficie de Chile infestados de picudo de Chile de manera controlada a las 48 h es modificado por la presencia del insecto con respecto a los controles al inicio y final del experimento los

cuales no tienen contacto con el insecto. Pero después de las 48 h de contacto con el insecto la estructura de la comunidad microbiana se modifica con respecto a la diversidad bacteriana presente a la 48 h aunque al menos cuatro OTU's dominantes presentes en ambas muestras nos sugieren una asociación de bacterias al fruto independiente del contacto con el insecto. Además se observa la presencia de un OTU solo en frutos infestados que por análisis de secuencias se identifico como *Bacterium* 512.

Finalmente el presente estudio nos permite establecer basados en los patrones de bandedo la premisa de que existe una asociación de bacterias en los frutos de chiles pero la estructura de las comunidades bacterianas del fruto de chile es modificado con la presencia del insecto. Los géneros que destacan son *Serratia*, *Bacillus*, *Pseudomonas* y *Enterobacter* presente tanto en el insecto como en los frutos de chile y finalmente *Pantoea* y *Salmonella* unicamente en el chile verde.

8.3 Cría de insectos.

Es indispensable plantear el objetivo que se tiene para los insectos criados en el laboratorio. Los resultados nos indican que estableciendo condiciones optimas en el laboratorio basados a datos de la biología del insecto (Elmore *et al.* 1934) y estudios preeliminares en laboratorio (Toapanta, *et al.* 2005) se logra establecer una colonia de insectos en condiciones controladas evitando de esta manera tener interpretaciones inválidas de los bioensayos para alternativas de control biológico, además de permitirnos realizar las pruebas en todos los estadios del insecto dependiendo de la necesidades que se tengan en campo para el control de este insecto.

La colonia establecida de insectos se inicio con al menos 545 picudos de chile obtenidos en el primer muestreo de acuerdo a lo establecido por Mackauer 1997 quien propone para la cría de insectos una colonia de insectos para el uso en pruebas de control biológico debe iniciarse al menos con 500 parásitos colectados en el campo, en un área suficientemente grande para incluir una buena diversidad genética que caracterice a la población paterna en forma adecuada.

El lograr iniciar la colonia en condiciones controladas fue resultado del éxito en la oviposición del insecto, en el estudio los resultados indicaron que el *A. eugenii* prefiere los frutos inmaduros de chile ($3 \text{ cm} \pm 2$) esto porque de acuerdo a la fisiología del insecto silvestre prefiere las flores, botones y frutos inmaduros de chile. Como lo menciona Porter et. al., 2007 los picudo de chile en condiciones controladas infestaron tres tamaños de chile (pequeños=1-1.4 cm, medianos 1.9-2.2, largos 2.6-3.1 cm) teniendo en todos los casos adultos emergido.

El tiempo de eclosión de los huevecillos al adulto de picudo de chile es dependiente de la temperatura esto se ha observado en campo como en el laboratorio en nuestros resultados tenemos la media de 16 días con la T 22-25 °C lo cual esta correlaciona con lo reportado en la literatura. (Topanta et al., 2005; Rodríguez, 2006; Porter et al., 2007).

Los insectos producidos en el laboratorio deben conservar sus características para ser empleados de tal manera que se comporten como los insectos silvestres por lo que se decidió alimentar a los insectos con fruto de chile porque la literatura reporta que los picudos de chile prefieren alimentarse de botones y fruto. Otra razón por la que se decidió alimentar con el fruto de chile a estos insectos y no buscar la opción de dietas artificiales es porque aunque se han reportado el uso de estas para la cría masiva de picudo de chile en

condiciones de laboratorio aun son pocos estudios y el utilizar este tipo de técnicas implica la inversión en tiempo, gasto económico, modificación de alimentación de los insectos y por lo tanto en el patrón de conducta. Además de que el utilizar el alimento original en campo permitía posteriormente utilizarlo como un patrón de calidad en la cría del insecto en el laboratorio.

Se proponen varios métodos de evaluación para insectos criados en el laboratorio (Huettel, 1976) entre ellos el de monitorear el desarrollo y alimentación de la larva. En la primer generación de insectos en condiciones de laboratorio se logro monitorear adecuadamente los huevecillos, tres instar de las larvas y el adulto de este insecto, los cuales tal como se indico en resultados conservaron sus características morfológicas iguales a las reportadas para las larvas en estado silvestre y al alimentarlos con frutos de chile como lo harían en campo se pudo observar que su patrón de alimentación sobre la pulpa del chile fue el mismo que de los insectos colectados en campo.

8.4 Enzimas hidrolíticas.

En general, las enzimas pueden actuar de forma independiente o realizar las reacciones metabólicas constituyendo cadenas de enzimas que operan de forma cooperativa, de tal manera que el producto de la catálisis de una enzima es el sustrato de la siguiente (Lehninger, 2006). Los resultados de la actividad total de las enzimas hidrolíticas nos muestran claramente que hay un cambio significativo en el metabolismo del insecto de huevecillo a Larva 1, esto directamente relacionado a los cambios en la fisiología del insecto.

Todas las enzimas glucosidasas, fosfatasas, esterases fueron activas observándose una baja actividad en lipasas y en proteasas la ausencia de la actividad de tripsina por lo tanto presentan un rol importante en la fisiología del insecto. Se reporta en la literatura que en los insectos la ingestión y características de la alimentación esta estrechamente correlacionadas con el tipo y naturaleza de las fuentes alimentarias (Sánchez *et al.* 2000). En coleópteros se observa que comen tejidos vegetales con alto contenido de líquidos, *A. eugenii* se alimenta de todas las especies de chile y de otras especies de la familia Solanaceae. *Capsicum* spp tiene alto contenido de carbohidratos por lo que la actividad enzimática de las glucosidasas esta claramente expresada en todos los estadios del insecto, sin embargo ocurre lo opuesto para el caso de las enzimas lipasas presentándose baja o nula actividad en el insecto, esto debido al bajo contenido de lípidos en el chile. Este insecto no presenta una clara actividad enzimática de la tripsina de acuerdo a lo reportado por Bravo en el 2004 las proteasas presentes en este grupo de insectos son cisteino y aspartato proteasas correlacionando los resultados obtenidos en este trabajo que nos muestran que la enzima tripsina no revela una clara actividad enzimática, sin embargo la amilasa esta siempre presente.

Como se señalo en el capítulo de resultados la enzima esterasa C4 fue activa en todo el ciclo de vida del picudo de chile, debido a la importante función de detoxificación que esta enzima desempeña en el insecto.

En resumen para un control biorracional de plagas es importante la caracterización de las proteínas involucradas en los diferentes procesos que regulan la comunicación química entre los estadios del insecto y las diferentes especies, que nos permitan elucidar mecanismos de acción y buscar compuestos que actúen específicamente en un tipo de

enzima tal como ocurre con las proteínas Cry del *Bacillus Thuriengiensis* que como característica importante es su alta especificidad y por lo tanto son inocuas para vertebrados y otros insectos no blanco (Ahmedani,, 2007).

8.5 Actividad insecticida.

Afortunadamente gran parte de los microorganismos que causan enfermedad a los insectos no ocasionan deterioro sobre plantas o animales lo cual permite el uso de bacterias patógenas como agentes control sobre los insectos plaga por lo que varias bacterias patógenas han sido utilizadas con éxito en el control de estos insectos (Lipa 1975, Jouvenaz *et al.* 1996; Sezen & Demirbag 1999; Yaman *et al.* 1999).

Se tienen reportes de que la mayoría de las especies de *Bacillus* ssp. son patógenas a los insectos y tienen diferentes propiedades insecticidas (Poinar, 1978; Deacon, 1983; Weller, 1988) pudiendo observar una relación clara con los resultados obtenidos en este trabajo donde la cepa identificada como *Bacillus* sp. aislada del insecto y *Bacillus cereus* aislada del fruto de chile mostraron una mortalidad en los picudos de chile.

Bacillus cereus está muy difundido en la naturaleza y se aísla con facilidad en suelo, cosechas de cereales, vegetación, pelo de animales, agua dulce y sedimentos. El organismo se encuentra en el interior o en la superficie de prácticamente todos los productos agrícolas frescos. Bacteria Gram positiva, familia bacillaceae, aerobio y anaerobio facultativo, esporulado con esporas centrales y forma elipsoide, crecen entre los 10 - 48°, la temperatura óptima es entre 30-37 °C. Generalmente son móviles con flagelos peritricos.

En el picudo de Chile se modificó la excreta de heces por *Enterococcus faecium* el cual es un coco Gram-positivo que se presenta en parejas (diplococos), siendo difícil distinguirlos de *Streptococcus* sólo en base a sus características físicas, es facultativo anaerobio.

Aun cuando *Bacillus cereus* se considera un patógeno oportunista en el hombre produciendo enfermedades gastrointestinales y *Enterococcus faecium* un comensal en el intestino humano, se propone a la cepa *Bacillus cereus* como la cepa con actividad insecticida con mayor posibilidad a tener una aplicación porque la literatura nos permite distinguir que los efectos negativos en el hombre producidos por esta bacteria pueden ser reducidos tomando precauciones simples de seguridad alimentaria con buenas prácticas de higiene y preparación de alimentos, así como utilizar las alternativas propuestas para el control biológico de patógenos bacterianos de humanos en productos frescos (Drobniewski 1993, Liao 2008, USDA 2008).

IX. CONCLUSION.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que la hipótesis planteada es verdadera ya que hay bacterias potenciales con actividad insecticida sobre *Anthonomus eugeni* Cano, las cuales forman parte de la comunidad bacteriana asociada al fruto de chile y al insecto adulto siendo los microorganismos dominantes de las Familias *Enterobacteriaceae* y *Bacillaceae*. La identificación de la cepa con capacidad insecticida fue *Bacillus cereus* BAC-B2 aislada del fruto de chile; sin embargo se debe destacar que es necesario realizar mas análisis para evaluar otras colonias que aun no reflejan un claro potencial insecticida.

X. REFERENCIAS

- Abreu, E. y Cruz, C. 1985. The occurrence of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) in Puerto Rico. J. Agri. Univ. Puerto Rico. 59: 223-224.
- Ahmad, M. y Burke, H.R. 1972. Larvae of the weevil tribe Anthonomini (Coleoptera: Curculionidae). Society of Ent America. E.U.A. 8: 35-54.
- Ahmedani, M.S., Khaliq, A., Haque, M.I. 2007. Scope of commercial formulations of *Bacillus thuringiensis* Berliner as an alternative to metil bromide against *Trogoderma granarium* Everts larvae. Pakistan J of Botany 39(3):871-880.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.H. 1995. Phylogenetic identification and in-situ detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiol Rev. 59(1):143-169.
- Arias, M.E. González, J.A., González F.J. y Ball A.S. 2005. Soil Elath- a new challenger for microbiologist and chemists. Int. Microbiol. 8:13-2.
- Arnett, R.H. 1973. The beetles of the United States. Amer Entom Inst Michigan. 757.
- Badii M.H., Flores A.E., Foreughbakhch R., Quiroz H. y Torres R. 1996. Ecología de manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control biológico de insectos. Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*, Universidad Autónoma de Nuevo León, Monterrey, México. 40-47.
- Bassam, B.J., G. Caetano-Anolles y Gresshoff, P.M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal Biochem 196:80-83.
- Biorad 2003. Protein detection Kit. Manufacturer's manual. 3th Ed. Biorad Laboratories, Hercules, CA.
- Bissel J.A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Rev Cubana Med Trop. 54(3):202-219.
- 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.
- Brar S.K., Verma, M., Tyagi, R.D. y Valero, J.R. 2006. Recent advances in downstream processing and formulation of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. Process Biochem 41(2):323-342.

Consejo Nacional de Productores de Chile, S.C. CONAPROCH. 2004. Curso-Taller Producción y Manejo Integral del Cultivo del Chile. Folleto Técnico Núm. 1.

Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas CICOPRAFEST. (Semarnap, Secretaría de Comercio y Fomento Industrial, Secretaría de Ganadería y Desarrollo Rural, Secretaría de Salud). 1998, 2002. Catálogo Oficial de Plaguicidas.

Conciella, C., Saccardo, A. E., y Saccardo, F.. 1990. Cytogenetic and isozyme studies of wild and cultivated *Capsicum annuum* L. Genome 33: 279-282.

DeSantis T.Z., Hugenholtz P., Keller K., Brodie E.L., Larsen N., Piceno Y.M., Phan R., y Andersen G. 2006. NAST: A multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. Nucl. Acids. Res. 34:W394-399

Devonshire AL. 1977. The properties of a carboxylesterase from the peach-potatoe aphid *Myzus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. Biochem. (167):675-683.

Dohrmann A.B., Tebbe C.C., 2004. Microbial community analysis by PCR-single-strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). En: Kowalchuk G.A., de Bruijn F.J.

Doutt, R. L. y Smith, R. F.1971. The pesticide syndrome: diagnosis and suggested prophylaxis. In: C. B. Huffaker. Biological control. Plenum Press, London. 3-15.

Drobniewski, F.A.1993. *Bacillus cereus* and related species. Clin Microbiol Rev 6:324–338.

Elmore, J. C., Davis, A. C., y Campbell, R. F.1934. The pepper weevil. U.S. Dept. Agr. Tech Bull. 447.27.

Elmore, J. C., y Campbell, R. E.1954. Control of the pepper weevil. J Econ Entomol.47: 1141-1143.

Escalante, A., Gosset, G., Martínez, A. & Bolívar F.2004. Diversidad bacteriana del suelo: Métodos de estudio no dependientes del cultivo microbiano e implicaciones biotecnológicas. Agrociencia. 38:583-592.

Estadísticas del Medio Ambiente, INEGI-SEMARNAP, 1999

Falcon, L. A. (1971). Use of bacteria for microbial control. In H.P. Burgess y N.W. Hussey (eds). Microbial Control of Insects and Mites. Academic Press, London. New York. 3: 67-95.

Fernández, W. L. y Estefanía, V. L.1974. Coconut water waste disposal of some desiccated coconut factories in the Philippines. Phil Agric 57: 359-363.

- Folsom, J. W. 1927. Calcium arsenate as a cause of aphids infestation. *J. Econ. Entomol.* 20: 840-843.
- García H.J.L. 2001. Evaluación de la fitotoxicidad ocasionada por insecticidas en chile (*Capsicum annum L*) cv. Ancho San Luis y Tomate (*Lycopersicon esculentum Mill*) cv. Rio Grande en La Paz, B.C.S. (México). Tesis Doctorado. CIBNOR. Mexico. 90.
- Gatehouse, A. M. R., Hilder, V. A., y Boulter, D. (1992). Potential of plantderived genes in the genetic manipulation of crops for insect resistance, *in: Biotechnology in Agriculture No 7: Plant Genetic Manipulation for Crop Protection*. CAB International, 155-181.
- Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, A. y Leifert, C. 2008. Soil Management for sustainable crop disease control: a review. *Environ Chemist Letters*6(3):149-162.
- Hancock, R.E.W. y Patrzykat, A. 2002. Clinical development of cationic antimicrobial peptides: from natural to novel antibiotics. *Curr Drug Targ Infect Dis* 2:79-83 (2002).
- Heimpel, A. M.1967. Critical review of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* Berliner and other crystalliferous bacteria. *Annu Rev Entomol* 12: 287-322.
- Huettel, M.D.1976. Monitoring the quality of laboratory-reared insects: a biological and behavioral perspective. *Environ Entomol* 5:807-814.
- Jan, J. y Borgne, L.S.2001. Uso de técnicas moleculares para realizar estudios de biodiversidad microbiana en ambientes petroleros. *Biotecnología*. 5(3) :103-109.
- Juárez G. M.E. INE-ADA-011/2004 Actualización de la base de datos de plaguicidas 2004.
- Khan, Z.R., James, D.G. Midega, C.A.O. y Pickett, J.A. 2008. Chemical ecology and conservation biological control. *Biol Control* 45(2):210-224.
- Klug, M. J. y Reddy, C. A. 1983. Current Perspectives in Microbial Ecology. Proceedings of the third international symposium on Microbial ecology. Michigan State University 7 – 12 August. American Society for Microbiology, Washington, D. C. 710.
- Krieg, A. y Herbert, G. M.1984. Bioinsecticides: I *Bacillus thuringiensis*. *Adv Biotechno Proc* 3: 273-290.
- Kunkel, H.O. 1968. Pupa of the weevil tribe Anthonominie (Coleoptera: Curculionidae) *Tex A y M Univ. USA*. 48.
- Lehninger, A., Nelson, D.L. y Cox, M.M.2006. Principios de Bioquímica. Ediciones Omega S.A. Cuarta Edición. España. 1013.

- Leonard, G.C., Julios, J.M. 2000. Review biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Manag Sci* 56, 651-676.
- Liao, C. 2008. Growth of salmonella on sprouting alfalfa seeds as affected by the inoculum size, native microbial load and *Pseudomonas fluorescens* 2-79. *Letters in Applied Microbiol.* 46:232-236.
- Luna, G.A.; Maeda, M.A.; Ascencio, V.F.; Robles, M.M. 2004. Ontogenetic variations of hydrolytic enzymes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Fish & Shellfish Immunol* 16:287-294.
- Mackauer, M. 1976. Genetic problems in the production of biological control agents. *Annu Rev Entomol* 21:369-385.
- Maidak B., Cole J., Parker C., Garrity G., Larsen N., Li B., Lilburn T., McCaughey M., Olsen G., y Overbeek R. 1999. A new version of the RDP (ribosomal database project). *Nucl. Acids. Res.* 27:171-173
- Maidak B.L., Cole J.R., Lilburn T.G., Parker C.T., Saxman P.R., Farris R.J., Garrity G.M., Olsen G.J., Schmidt T.M. y Tiedje J.M. 2001. The RDP-II (ribosomal database project). *Nucl. Acids. Res.* 29:173-174
- Martínez P. y Arriaga B.G. 1998. Atlas de ubicación de productos agropecuarios utilizados en la planificación y desarrollo de la acuicultura en México. *Project Reports AQUILA*. 103.
- Martínez, M.L. 2004. El control de calidad en la cría de insectos: Bautista, M.N., Bravo M.H., Chavarin P.C. Primera Edición. *Cría de Insectos Plaga y Organismos Benéficos*. Edt. Colegio de Posgraduados, Texcoco, Estado de México. 35-53.
- Matson, P.A., Parton, W.J., Power, A.G., y Swift, M.J. 1997. Agriculture Intensification and ecosystem properties. *Sci* 277:504-509.
- Matthew, B.T., 1999. Ecological approaches and the development of “truly integrated” pest management. *Proc Natl Acad Sci* 99:5944-5951
- Metcalf, C.L. y Flint, W.P., 1965. *Insectos Destructivos e Insectos Utiles*. Compañía Editorial Continental, S.A. México, D.F. 1206.
- Miethling R., G. Wieland, H. Backhaus and C. C. Tebbe. 2000. Variation of microbial rhizosphere communities in response to crop species, soil, origen, and inoculation with *Sinorhizobium meliloti* L33. *Microb. Ecol.*, 40:43-56.
- Mohr, K.I y Tebbe, C.C. 2006. Diversity and phylotype consistency of bacteria in the guts of three bee species (Apoidea) at an oilseed rape field. *Environm Microbiol* 8(2):258-272.

- Montesinos, E. 2003. Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection. *Int Microbiol* 6(4):245-252.
- Mouches C., Magnin M., Berge J.B., De Silvestri M., Beyssat V., Pasteur N., Georghiou G.P. 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proc Natn Acad Sci. USA.* 84:2113-2116.
- Nishiwaki H. , Ito K., Shimomura M., Nakashima K. y Matsuda K. 2007. Insecticidal bacteria isolated from predatory larvae of the antlion species *Myrmeleon bore* (Neuroptera: Myrmeleontidae). *J of Inver Pathol.* 96(1):80-88.
- Oliveira, M.S., Nascimento, M.A., Cadavos, C.F.G., Chaves, J.Q., Rabinovitch, L., Lima M.M. y Queiroz, M.M.C. 2006. Biological Activity of *Bacillus thuringiensis* Strain against Larvae of the Blowfly *Chrysomya putoria* (Wiedemann)(Diptera:Cualliphoridae). *Neotropical Entomol* 35(6):849-852.
- Ovreas L. 2000. Population and community level approaches for analysing microbial Diversity in natural environments. *Ecol Letters.* 3:236-251.
- Palleroni, J.N.. 1997. Prokaryotic Diversity and the importante of culturing. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol.* 72(1):127-141.
- Paoletti, M.G. y Pimentel D. 2000. Environmental risks of pesticides versus genetic engineering for agricultural pest control. *J of Agric & Environ Ethics* 12(3):279-303.
- Patrock, R. J., y D. J. Schuster. 1992. Feeding, oviposition, and development of the pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano) on selected species of Solanaceae. *Trop Pest Manag.* 38: 65-69.
- Pechy-Tarr, M., Bruck, D.J., Maurhofer, M., Fischer, E., Vogne, C., Henkels, M.D., Donahue, K.M., Gruder, J., Loper, J.E., Keel, C. 2008. Molecular análisis of a novel gene cluster encoding an insecto toxin in plant-associated strains of *Pseudomonas fluorescens*. *Envirom Microbiol* 10(9):2368-2386.
- Pfister D.T y Storey B.K. 2006. Insect freeze tolerance: Roles of protein phosphatases and protein kinase A. *Insect Biochem and Mol Biol.* 36(1):18-24.
- Porter, P., Lewis, B.E., Scanlon, R. y Murray, L. 2007. Pepper weevil infestation of cv. early jalapeno peppers of different size classes. *Southwest Entomol* 32(1):1-6.
- Punnet, K., Nirupama B.. 2003. Insecticidal Activity Associated with the Outer Membrane Vesicles of *Xenorhabdus nematophilus*. *AEM.* 69: 2032-2037.

Quiñónez P., F. y Luján F., M. 2002. Differential response of jalapeño genotypes to the damage for pepper weevil (*Anthonomus eugenii* Cano). In: Proceedings of 16th International Pepper Conference. November 10-12, 2002. Tampico, Tams., Mex. Pag. 44

Rada, V., Machova, M., Huk, J., Marounek, M., and Duskova, D. 1997. Microflora in the honeybee digestive tract: counts, characteristics and sensitivity to veterinary drugs. *Apidologie* **28**: 357–365.

Reyes B.E. 1984. Estudio Bioecológico, hospederas alternantes y cría masiva del barrenillo del chile, *Anthonomus eugenii* Cano. Tesis. Inst. Tec. de Estudios superiores de Monterrey pp. 3

Riley, D. G., and Schuster, D. J. 1992. The occurrence of *Catolaccus hunteri*, a parasitoid of *Anthonomus eugenii*, in insecticide treated bell pepper. *Southwest Entomol.* 17:71-72.

Riley, D. G., y King, E. G. 1994. Biology and management of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae): a review. *Trends Agri Sci.* 2: 109-121.

Riley, D. G., and D. J. Schuster. 1994. Pepper weevil adult response to colored sticky traps in pepper fields. *Southwest Entomol* 19: 93-107.

Riley, D. G., y Sparks, A. N. 1995. The pepper weevil and its management. *Texas Agri. Ext. Serv. Texas A&M Univ.* L-5069.

Ritchie, N. J., Schutter, M. E., Dick, P. P. y Myrold, D. D. 2000. Use of length heterogeneity PCR and fatty acid methyl ester profiles to characterization microbial communities in soil. *Appl. Environ Microbiol.* 66(4):1668-1675.

Rodriguez, L.E. 2006. Life history of *Triaspis eugenii* Wharton and Lopez-Martinez (HYMENOPTERA: BRACONIDAE) and evaluation of its potencial for biological control of pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (COLEOPTERA: CURCULIONIDAE). Tesis Doctorado. Universidad de Florida. Pp 110.

Rodriguez L, E., Stansly, P.A., Schuster, D.J. y Bravo-Mosqueda, E. 2007. Diversity and distribution of parasitoids of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera:Curculionidae) from Mexico and prospects for biological control. *Florida Entomol* 90(4):693-702.

Rong, T., Romanchuk F. E., Peterson C.J., Coats J. R. 2002. Plant growth regulatory effect and insecticidal activity extracts of the Tree of Heaven (*Ailanthus altissima* L.); *BMC Ecology* 2:1.

Russell, T.L., Kay, B.H. 2008. Biologically based insecticidas for the control of immature Australian mosquitoes: a review. *Austr J of Entom* 47:232-242.

Sambrook, J., Fritsch E. F. y Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning- A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

Sánchez P.A., Sánchez F., Caetano F.H., Jaffé K. 2000. El tubo digestivo en adultos de *Rhynchophorus palmarum* (L.) (Coleoptera: Curculionidae): Morfología y ultraestructura. Bol Entomol Venez 15(2):195-216.

Sauka, D.H. y Benintende, G.B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: general aspects. An approach to its use in the biological control of lepidopteran insects behaving as agricultural pest. Rev Argen de Microbiol 40(2):124-140.

Schloss, P.D. y Handelsman, J. 2005. Introducing DOTUR, a Computer Program for Defining Operational Taxonomic Units and Estimating Species Richness. App and Environm Microbiol 71(3):1501-1506.

Schuster, D.J. 2007. Suppression of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera:Curculionidae) pepper fruit infestation with releases of *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera:Pteromalidae).

Seal, D.R., Stansly, P.A. y Schuster, D.J. 2002. Influence of Temperature and Host on Life History Parameters of *Catolaccus Hunteri* (Hymenoptera:Pteromalidae). Environ Entomol 31(2):354-360.

Selim, S., Martin-Laurent, F., Rouard, N., Gianinazzi, S. y Van Tuinen, D. 2007. Impact of a new biopesticide produced by *Paenibacillus* sp. strain B2 on the genetic structure and density of soil bacterial communities. *Pest Manag Sci* 63:269–275.

SEMARNAP-INE. 1999. Lo que usted debe saber sobre los plaguicidas. Serie Plaguicidas No. 1. México.

Servín, R. y Aguilar R. 2000. Bioensayos Toxicológicos en Picudo del Chile *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera:Curculionidae) por exposición residual, en Baja California Sur, México. *Folia Entomol Mex.* 109:117-118.

Servín, R., Aguilar, R., Martínez, J.L., Troyo E. y Ortega A. 2002. Monitoring of resistance to three insecticides on pepper weevil (*Anthonomus eugenii*) in populations from Baja California Sur, México. *INCI.*27(12):691-694.

Servín, R.; García H.J.L y Troyo D.E. 2007. Buenas Prácticas en el Manejo de Plagas para una Agricultura, Ganadería y Producción Forrajera Sostenibles en Zonas Áridas. Edit. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. Primera Edición. La Paz, B.C.S. México. 85.

Sezen, K.; Muratoglu, H.; Nalcacioglu, R.; Mert, D.; Demirbag, Z.; Kati, H. Highly pathogenic *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis* from European shot-hole borer,

Xyleborus dispar (Coleoptera:Scolytidae). New Zea J or Crop and Horticult Sci 36(1):77-84.

Shi, Y.F. 2000. Advances of insecticidal microorganisms. Plant Protection 26:32-34.

Singh, P. y Moore, R.F.. 1985. Handbook of insect rearing. Vol II. Elsevier, Nueva York.

Stanier, R., Adelberg, E. A. y Igraham, J. L. 1986. Microbiología. Cuarta Edición, México. 621-624.

Sunnuck, P., Wilson, A.C.C., Beheregaray, L.B., Zenger K. French J. y Taylor A.C.2000. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology; Molec Ecol 9:1699-1710.

Tebbe, C.C.; Schmalenberger A.; Peters S. y Schwieger F.2001.Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) for Microbial Community Analysis; Environmental Molecular Microbiology: Protocol and Applications; Horizon Scientific Press, Wymondham, UK. 161-175.

Toapanta, M. A. 2001. Population ecology, life history, and biological control of the pepper weevil, *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae). Ph.D. Dissertation, Univ. of Fla. Gainesville. 151-108.

Toapanta, M. A., Schuster, D. J., y Stansly, P. A. 2005. Development and life history of *Anthonomus eugenii* (Coleoptera: Curculionidae) at constant temperatures. Environ Entomol 34: 999-1008.

Torsvik, V., Goksoyr, J. y Daae, F.L. 1990. High diversity in DNA of soil bacteria. Appl Environ Microbiol. 56:782-787.

Tumlinson, J.H. 1997. A total system approach to sustainable pest mangement. Proc Natl Acad Sci. USA, 12243-12284.

United States Departamento of Agriculture. 2008. Agricultural Research Service. Beneficial Bacteria Help Control Produce Pathogen..

Vavilov, N. I. 1951. Phytogeographic basis of plant breeding: the origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants. Translated by K. S. Chester. Chronica Botanica Co. 3. Liden Waltham, Massachusetts.

Van Driesche, R. G. y Bellows T. S. 1996. Biological control. Chapman & Hall, New York.

Vazquez, E., D. Dean, D. Schuster, and P. V. Etten. 2005. A laboratory method for rearing *Catolaccus hunteri* (Hymenoptera: Pteromalidae), a parasitoid of the pepper weevil (Coleoptera: Curculionidae). Fla Entomol 88: 191-194.

- Velasco, P. H. 1969. Evaluación de pérdidas, preferencia de oviposición del picudo o barrenillo del chile (*Anthonomus eugenii* Cano). Efectividad de varios insecticidas y reacción de diferentes variedades a su ataque. Agr Tec Mex. 499-507.
- Waage, J.K., 1993. In Agriculture and Environmental Challenges: Proceedings of the Thirteenth Agricultural Sector Symposium, eds. Srivastava, J.P. and Alderman, H. (World Bank, Washington, DC). 119-134.
- Weller, M.W. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Rev of Phytopathol. 26: 379-407.
- Wilson, R. J. 1986. Observations on the behavior and host relations of the pepper weevil *Anthonomus eugenii* Cano (Coleoptera: Curculionidae) in Florida. M.S. Tesis, Univ. de Fla. Gainesville. 94 p.
- Wink, M. 1993. Production and application of phytochemicals from an agricultural perspective. Phytochemistry and Agriculture; Clarendon Press: Oxford; 171–213.
- Xie, M.J. 1998. The perspectiva of the studies on microbial insecticidas. Journal of Liaoning Normal University (Natural Science) 21: 326-329.
- Xiong, L., Li, J. y Kong, F. 2003. Streptomyces sp. 173, and insecticidal micro-organism from marine. Letter in Applied Microbiol 38:32-37
- Zhang, D.F. 1996. Recent developments in research and utilization of microorganisms. J of Anhui Agricul Sci 24 (Suppl. 1): 44-46.