



## CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner TÓXICAS A *Phthorimaea operculella* (Zeller).

Goyo-Morillo Yaritza<sup>1,2</sup>, Méndez N.<sup>3</sup>, Jiménez M.<sup>3</sup>, Rodríguez J-P.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ESAT-INIA. Doctorado de Biotecnología agrícola, mención vegetal, <sup>2</sup>UCLA. Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Apto 400, Barquisimeto, Venezuela. e-mail: yaritgo@gmail.com. <sup>3</sup>UCLA. Postgrados de Agronomía, Decanato de Agronomía, Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Venezuela. <sup>4</sup>IDECYT.

**ASA/EX -2016-09.**

**Recibido: 16-10-2016**

**Aceptado: 18-04-2017**

### RESUMEN

El uso de *Bacillus thuringiensis* como controlador biológico ha sido escaso en Venezuela y aunque se cuenta con un banco de cepas nativas con potencial tóxico sobre varios insectos plaga, su evaluación ha sido parcial. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar morfológica y molecularmente cepas nativas de Venezuela de *B. thuringiensis* tóxicas a *P. operculella* insecto que ataca al cultivo de papa. Para ello, los cristales de las cepas nativas UCLABt- 01, UCLABt- 44, UCLABt- 64, UCLABt- 67, UCLABt- 202, UCLABt- 204 y la cepa control de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), se sometieron a estudios de microscopía de transmisión para su caracterización morfológica. Para la identificación de genes *cry1Ac* se utilizó la técnica de PCR usando los cebadores CJ-1 y CJ-2,19 con el fin de identificar las cepas portadoras del gen que codifica la toxina contra el insecto. Todas las cepas mostraron la inclusión parasporal de forma bipiramidal, típico del patotipo I y tóxicos a lepidóptero. El análisis del contenido génico mediante PCR demostró que todos los perfiles de amplificación se lograron con los cebadores específicos para el gen *cry1Ac* incluyendo el control positivo, excepto la cepa UCLABt-64. El contenido génico encontrado no es definitivo, por cuanto se recomienda seguir estandarizando y utilizar otros cebadores como los de *cry9A*, *cry9B* y *cry9C* que podrían indicar la presencia de genes *cry* adicionales a los encontrados.

**Palabras clave:** Control biológico, PCR, cepas nativas, genes *cry*.



## MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF NATIVE STRAINS *Bacillus thuringiensis* Berliner TOXICS TO *Phthorimaea operculella* (Zeller).

### ABSTRACT

The use of *Bacillus thuringiensis* as biological control has been poor in Venezuela and even has a bank of native strains with toxic potential on various insect pests but its evaluation has been partial. The objective of this work was to characterize morphologically and molecularly natives strains of Venezuela toxic of *B. thuringiensis* against *P.operculella* from the potato crop. The strains UCLABt- 01, UCLABt- 44, UCLABt- 64, UCLABt- 67, UCLABt- 202, UCLABt- 204. As control strain was used *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1) were analyzed by studies of transmission for morphological characterization of the crystals were performed. For identification of genes *cry1Ac* did use the PCR technique using the primers CJ-1 y CJ-2,19. Identify the gene encoding the toxin against the insect. All strains showed parasporal inclusion of bipyramidal form, typical of patotipo I, a Lepidopteran toxic. The gene content analysis by PCR showed that all amplification profiles were obtained with specific primers for the gene *cry Ac* including positive control except UCLABt-64 strain. Gene content is not definitive by itself, the track recommends standardizing and others how to use initiators *cry9A*, *cry 9B* y *cry 9C*, *cry 9A*, *cry 9B* y *cry9C*, could indicate the presence of additional genes to those found *cry*.

**Keyword:** Biological control, PCR, native strains, *cry* genes.



## INTRODUCCION

**L**a papa (*Solanum tuberosum* L.) constituye uno de los principales rubros agrícolas porque el producto comercial se emplea tanto para consumo como para semilla (Ojeda *et al.* 2010; Rondón, 2010).

Por otra parte *Phthorimaea operculella* (Zeller) es un insecto que ataca cultivos pertenecientes a las solanáceas en todo el mundo pero, es especialmente devastadora para el cultivo de la papa.

Dentro de las alternativas para el manejo del insecto, se ha planteado el control microbiano con los Baculovirus y *Bacillus thuringiensis* (Lacey *et al.* 2010).

La bacteria *B. thuringiensis* (Bt), ha recibido gran atención debido a sus propiedades insecticidas, gracias a su capacidad para sintetizar cristales tóxicos o inclusiones parasporales proteínicas durante su esporulación, que pueden estar constituidos por la agregación de una o varias proteínas, denominadas proteínas Cry o  $\delta$ -endotoxinas, codificadas por los

denominados genes *cry*, que además de ser responsables de las propiedades entomocidas son características para cada una de las especies de insectos plagas de importancia agrícola (Schnepf *et al.* 1998; Tamez, *et al.* 2005).

La diferencia en los niveles de toxicidad de las cepas de *B. thuringiensis* nativas en estudio se reportaron por Bastardo, 2006, donde se evaluó el efecto tóxico de las proteínas utilizando larvas del primer instar de *Phthorimaea operculella*. Se observó que las cepas tuvieron un efecto tóxico entre un 43 y 90%. Las cepas UCLABt-193, UCLABt-197 presentaron una toxicidad de 43 y 50%, respectivamente y las cepas UCLABt-67, UCLABt-204 de un 60 y 63%. Las cepas UCLABt-202, UCLABt-44 y UCLABt-1 de un 84 a un 90% de mortalidad y el control positivo HD-1 un 95 % de toxicidad. Estos resultados evidencian el potencial toxico de las cepas nativas y es por ello que se escogen las cepas mayor a 60% de mortalidad.

Las cepas de Bt varían ampliamente por su capacidad para producir una serie



de toxinas y por lo tanto tienen diferentes rangos de hospedantes. En Venezuela existe un banco de cepas nativas de la bacteria *B. thuringiensis* caracterizadas parcialmente, mediante su morfología, patrón proteico y genético (Bulle, 2002; Carmona, 2002; Ramos *et al.* 2004; Falcón, 2005; Goyo, 2005; Bastardo, 2006) representando una alternativa para su control.

El proceso de caracterización de dichas cepas de Bt puede ser mediante la observación morfológica del cristal, ya que son detectables al microscopio óptico, de contraste de fases y al microscopio electrónico de transmisión y de barrido (Macintosh *et al.* 1990; López, 1993).

Además se ha empleado, el perfil de proteínas y se ha correlacionado con el tipo del gen *cry* presente en una determinada cepa o aislamiento así como con su actividad insecticida (Porcas y Juárez-Pérez, 2003) empleando para la identificación de los genes *cry*, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Tamez *et al.* 2005).

Determinar cepas de Bt, que en estudios previos al presente han manifestado elevado potencial tóxico cuando fueron probadas frente a larvas de primer instar de *P. operculella* (Bastardo, 2006), caracterizarlas para utilizarlas como fuentes de nuevos genes *cry*, proporcionaría información sobre la oportunidad de seleccionar cepas para elaborar bioinsecticidas que permitirían fomentar y proponer un manejo efectivo de la plaga en los programas de protección de semilla de papa tanto en el campo como bajo condiciones de almacenamiento. Por ello, el presente trabajo muestra la caracterización morfológica y molecular de cepas nativas de *B. thuringiensis* tóxicas a *P. operculella* insecto que ataca al cultivo de papa, utilizando 6 cepas de Bt nativas de Venezuela conforme a la morfología del cristal bipiramidal y el patrón de sus proteínas Cry que mostraron en estudios previos potencial tóxico frente a *P. operculella*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

El estudio fue llevado a cabo en las instalaciones los Postgrados de



Agronomía, de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" (UCLA-Barquisimeto) y los estudios de microscopía en el Laboratorio de Microscopía Electrónica CEBIV – IDECYT, de la Universidad Simón Rodríguez.

Las cepas bacterianas nativas de *B. thuringiensis* tóxicas a Lepidópteros, utilizadas pertenecen a la colección del laboratorio de Biología Molecular de la UCLA e identificadas como: UCLABt-01, UCLABt- 44, UCLABt- 64, UCLABt- 67, UCLABt- 202, UCLABt- 204. Como cepa control se utilizó *B. thuringiensis* var. *kurstaki* (HD-1), todas las cepas se sembraron en medio agar nutritivo (AN), a 30°C durante 48 horas hasta completar la fase de esporulación y así su reactivación para posterior estudios morfológicos y moleculares.

### **Microscopía Electrónica de Transmisión**

La observación de los cuerpos parasporales se realizó con un Microscopio Electrónico de Transmisión HITACHI H-7100. Se aplicó la técnica de suspensión usando una asada de la

muestra y suspendiéndola en 200  $\mu$ L de agua bidestilada, se colocó una gota de cada muestra sobre la rejillas previamente tratadas con luz UV y recubierta con una película *formvar* con carbón, durante 5 min, se retiró el exceso de agua con papel filtro y seguidamente, se colocó una gota de Uranilo al 2% durante 5 min, retirando el exceso de reactivo. Se tomaron dos réplicas de cada muestra en concentraciones 50/50 y 75/25 para ser observadas al microscopio electrónico de transmisión.

### **Obtención de ADN y amplificación mediante PCR.**

El aislamiento de ADN genómico de células vegetativas de Bt se realizó mediante la técnica descrita por Cerón *et al.* (1994, 1995). Para ello, las cepas se cultivaron durante en placas con AN a 30 °C durante 24 horas hasta completar la fase vegetativa o fase logarítmica en pleno crecimiento y obtener mayor contenido de ADN. Una asada de la colonia se transfirió a un tubo Eppendorf con 0,1 mL de agua destilada. Las muestras se mantuvieron a -75 °C por 15 min. Posteriormente, el tubo se calentó a



100 °C por 10 min, al término de los cuales las muestras se sometieron a centrifugación a 10.000 rpm por 10 s. Seguidamente, se extrajo una alícuota de 10 mL del sobrenadante usando una fracción de esta alícuota que se empleó como ADN molde para su amplificación mediante PCR. Previamente se estandarizó la concentración de ADN y la temperatura de alineación.

La identificación de genes *cry* se analizó mediante PCR siguiendo la metodología propuesta por Cerón *et al.*, (1995). Los genes *cry1* se identificaron de acuerdo a la clasificación reciente usando los cebadores: CJI1 5'TGTAGAAGAGGAA GTCTATCCA-' 3 y el cebador CJI-2 5'-TATCGGTTTCTGGGAAGTA-3' que son específicos para la amplificación de genes *cry1Ac*. Se utilizaron las siguientes condiciones de amplificación: 1 ciclo de 1 min a 94 °C, 30 ciclos de 1 min a 94 °C, 2 min a 48 °C, 3 min a 72 °C y 1 ciclo final de 10 min a 72 °C. Es importante señalar que la temperatura de alineación de los primer reportada por Bravo *et al.* (1998) fue de 51 °C y que en el presente estudio fue estandarizada la técnica hasta obtener resultados positivos para el control.

Los productos de la amplificación por PCR se separaron mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1,5%; el número de bases se estimó por comparación con el marcador molecular DNA Ladder de 100 a 1500 pb.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Microscopia Electrónica de Transmisión

La micrografía al microscopio electrónico de transmisión (Figura 1) permitió reconocer que los esporangios y los cristales parasporales de las cepas UCLABt-64, UCLABt-67, UCLABt-202, UCLA-Bt-204 y el testigo HD-1, no presentaron diferencias en cuanto a la morfología. UCLA-Bt-01, UCLA-Bt-44, también presentaron cristales bipiramidales aunque no se reportan las micrografías.

Es de hacer notar que la cepa UCLABt-202 presentó cristales de 0,58 µm de diámetro, siendo estos los de menor tamaño y la cepa UCLABT-67 presentó cristales de 2,5 µm de diámetro, presentando el mayor tamaño, el resto de



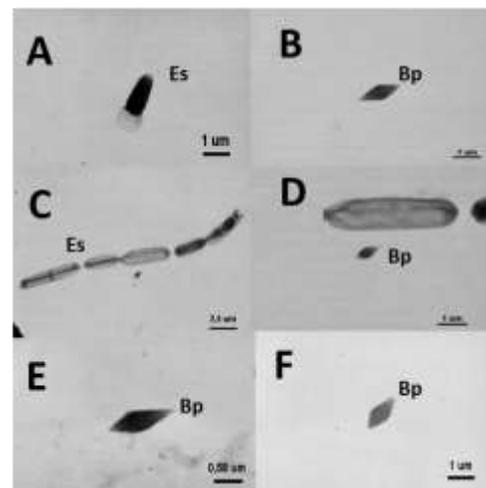
las cepas incluyendo la cepa control HD-1 presentaron diámetros de 1  $\mu\text{m}$ .

Estudios previos señalaron que la morfología, tamaño y número de las inclusiones parasporales varían entre las diferentes cepas de *B. thuringiensis*, y son visibles al microscopio electrónico de transmisión y de barrido. Aunque generalmente predomina la forma bipiramidal, es posible distinguir diferentes morfologías como, esférico-amorfo, rectangular, cuadrado y en forma de barra. En otros casos pueden presentarse esféricos, cúbicos y de diferentes tamaños o cuadrada aplanada más pequeña (Benintende *et al.*, 2000; Carreras, 2003; Del Rincón-Castro *et al.* 2006).

Se plantea que el cristal bipiramidal (pertenecientes al Patotipo I) generalmente se asocia con la toxicidad de la cepa contra insectos lepidópteros, los cristales cúbicos y ovoides son activos tanto para lepidópteros como dípteros, y se relaciona a la inclusión cúbica con la proteína Cry 2 (Glare y Callaghan, 2000; Gitahy *et al.* 2007) y constituyen los patotipos I y II mientras que en el patotipo III se incluyen formas tanto

aplanadas como cuadradas, activas contra algunas especies de coleópteros solamente (Baró *et al.* 2009).

Los cristales bipiramidales se asocian con la presencia de una proteína de 130kDa mientras que los cúbicos se asocian con la de una de 65kDa (Del Rincón-Castro *et al.* 2006) y a su vez ambas proteínas son un indicativo de la toxicidad de las cepas hacia insectos del orden Lepidóptera (Baró *et al.* 2009). No obstante, aunque esta correlación ha sido cuestionada (Niedmann, y Meza-Basso, 2006) lo más resaltante es que la proteína



**Figura 1. Micrografías por microscopía electrónica de transmisión mostrando la morfología de los cristales de *Bacillus thuringiensis*.: A. control positivo cepa HD-1; B. cepa UCLABt-64; C. Cepa UCLABt-67; D. Cepa UCLABt-67; E. Cepa UCLABt-202; F.**



### **Cepa UCLABt-204. Bp: Cristales Bipiramidales; Es: Esporangios**

parasporal bipiramidal corresponde al presencia del cristal patotipo del gen *cryI*, esta característica es muy importante porque los cristales compuestos por las proteínas Cry, son las que desarrollan en principio la toxicidad que se aumenta con la entrada de esporas al hemocele de la larva. Además, la síntesis de dicha proteína está relacionada con la presencia de genes que la codifican localizados en plásmidos de alto peso molecular (Glare y Callaghan, 2000; Gitahy *et al.* 2007), mientras que los cristales cúbicos y ovoides son activos tanto para lepidópteros como dípteros, y se relaciona a la inclusión cúbica con la proteína Cry 2 (Glare y Callaghan, 2000).

### **Amplificación del gen Cry1Ac mediante PCR**

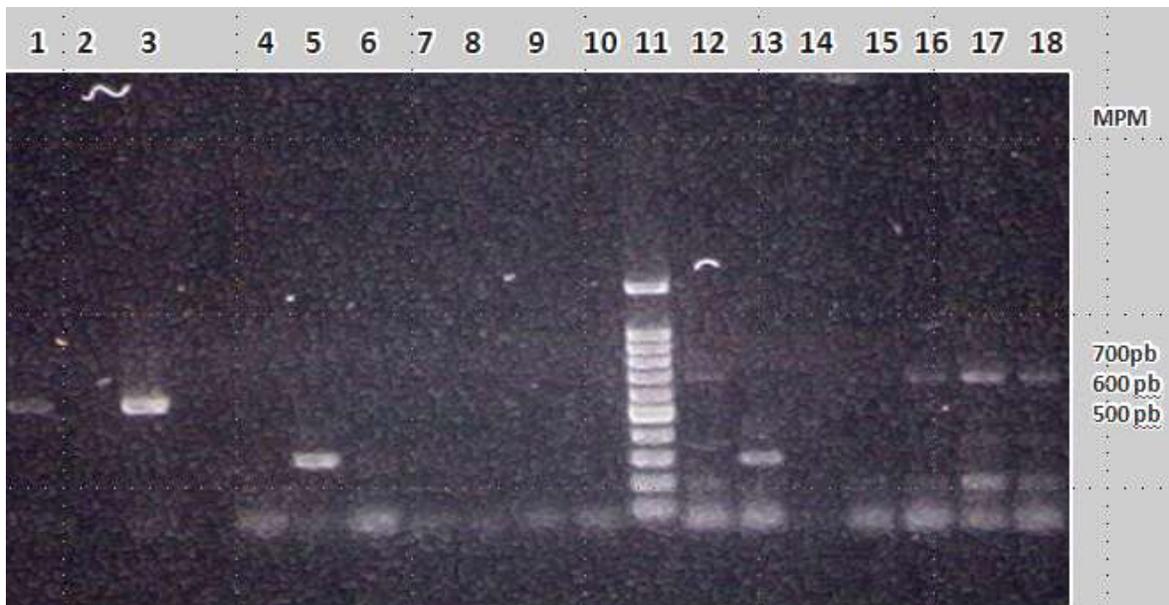
El análisis electroforético de los productos de PCR que se visualizan en la Figura 2, evidenciando las cepas de *B. thuringiensis* con el cebador CJI-1. mostró que la cepa control HD-1 y UCLABt-44, presentaron productos de amplificación que fluctúan entre 500 pb y

600 pb, una banda única y de alta intensidad mostrando que son similares, y confirmando la especificidad del cebador CJI-1 y la presencia del gen *cryIA*. Las cepas bajo estudio no presentaron amplificación con el cebador CJI-2 por lo tanto este no permitió la identificación de los genes *cry9* de forma específica. Las cepas UCLA Bt-67, UCLABt-202 y UCLABt-204 amplificaron con una banda que se encuentra entre 600 pb y 700 pb. Así UCLABt-204 amplificaron con una banda que se encuentra entre 600pb y 700 pb. Así mismo, la cepa UCLABt-1 evidenció una banda de aproximadamente 300 pb. (Los cuales no coinciden con el peso de los genes *cry1Ac*). Por lo tanto las cepas UCLA Bt-1, UCLA Bt-44, UCLA Bt-67, UCLA Bt-202 y UCLA Bt-204 se consideraron como positivas para la presencia de genes *cry1A* cuando fueron comparadas con la cepa control HD-1, mientras que UCLA Bt-64; UCLABt-67; UCLABt-202 no mostraron ningún producto de PCR a pesar de que producían cristales proteicos se podría especular que los genes *cry* en las cepas donde no hubo amplificación, tal vez no



fueron reconocidos por los oligonucleótidos empleados y podrían representar, potencialmente, nuevos genes *cry*, pero para ello deben probarse con otros juegos de cebadores para otras proteínas Cry. Estudios previos mostraron que a nivel de genes *cry* en *B. thuringiensis* se conocen cinco regiones conservadas designadas como bloques o dominios, los cuales están presentes en casi todos los genes *cry* (Ben-Dov *et al.*

2001). En este trabajo solamente se utilizaron dos oligonucleótidos universales lo cual afectó la eficiencia en la identificación de genes *cry*. Estos resultados coinciden con los presentados por Del Rincón-Castro *et al.* (2016) quienes señalaron que se podría especular que los genes *cry* en las cepas donde no hubo amplificación, tal vez no fueron reconocidos por los oligonucleótidos empleados y podrían



**Figura 2.** Análisis electroforético en un gel de agarosa al 1,5% de los productos de PCR, usando los cebadores específicos para los genes *cry1A* en las cepas de *B. thuringiensis* estudiadas. 1. control positivo de *B. thuringiensis* HD-1; 2. cepa UCLA Bt-1; 3. cepa UCLA Bt-44; 4. control negativo (sin muestra) ; 5. cepaUCLABt -1; 6. cepa UCLA Bt-44; 7. cepa UCLA Bt-64; 8. cepa UCLABt-67; 9. cepa UCLABt-202; 10. cepa UCLA BT-204; 11. Marcadores moleculares en pb; 12. control positivo de *B. thuringiensis* HD-1; 13. cepa UCLABt-1; 14. cepa UCLABt-44; 15. cepa UCLABt-64; 16. cepa UCLA Bt-67; 17. cepa UCLABt -202; 18. cepa UCLABt.-204.



representar potencialmente, nuevos genes *cry* por lo que estas cepas podrían portar genes *cry* aún no clasificados.

Los resultados demostraron que la temperatura más adecuada para la amplificación fue la de 51°C, ya que formó una sola banda, mientras que la temperatura de 48 °C, generó productos inespecíficos que son las bandas que se observan por debajo de los 500 pb, sin embargo amplificaron mas cepas con la temperatura de 48 °C. Estos perfiles de amplificación que orientan acerca del contenido génico de cada cepa de Bt en estudio fueron conseguidos con los cebadores anteriormente descritos.

### CONCLUSIONES

Las cepas nativas y la cepa control HD-1 presentaron en su morfología un cuerpo de inclusión parasporal de naturaleza proteica de forma bipiramidal, los cuales oscilaron entre 0,58 a 2,5µm de diámetro, además la presencia de estos cristales indican la presencia de los genes *cry* que se correlacionan con la posible actividad tóxica frente al orden Lepidoptera de los insecto, esto se pudo

observar por microscopía electrónica de transmisión.

El perfil electroforético pudo determinar que los cristales observados tienen la presencia de tamaños similares a las proteínas Cry1A, y la caracterización molecular de las cepas HD-1, UCLA Bt-1, UCLA Bt-44, UCLA Bt-67, UCLA Bt-202 y UCLA Bt-204 por amplificación por PCR con la utilización de oligonucleótidos universales permitió la amplificación del gen *cry1Ac* en sus diferentes temperaturas y 10 µl de ADN. La cepa UCLA BT-64 no amplificó para este gen por lo que se recomienda probar con otros juegos de cebadores para otros genes *cry*.

### AGRADECIMIENTO

A la empresa INSUBIOL C.A, por la realización de la investigación, al Consejo Científico y Tecnológico (CDCHT) de la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado por el aporte de reactivos y al Instituto de Estudios Científicos y Tecnológicos (IDECYT) por facilitar el uso de sus instalaciones y equipos para la realización de los ensayos experimentales.



## REFERENCIAS

- Baró Robaina, Yamilé; Fontana Capalbo, Deise M; Dos Santos Nascimento, Rosely (2009). Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y actividad biológica hacia *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae) Fitosanidad, 13(3): 187-192.
- Bastardo L (2006). Caracterización cepas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a *Phthorimaea operculella*. Tesis de trabajo de grado. Licenciado en Biología. Universidad de oriente. Cumana. Venezuela.
- Ben-Dov E, Manasherob R, Zaritsky A, Barak A, Manglith Y (2001). PCR Analysis of *cry7* genes in *Bacillus thuringiensis* by five conserved block of toxins. Current Microbiology 42 : 96-99
- Benintende, G.; J. López-Meza; J. Cozzi; C. Piccinetti; J. Ibarra.(2000).. Characterization of INTA 51-3, a New Atypical Strain of *Bacillus thuringiensis* from Argentina, Curr. Microbiol. 41:396-401, EE.UU.
- Bullé, M. (2002). Aislamiento y Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con potencial para el control de insectos plagas en la agricultura. Tesis de grado: Ingeniero Agrónomo. No publicada. UCLA Decanato de Agronomía. P.59.
- Carmona, A. (2002). Aislamiento y Caracterización de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) *Bioagro*, 14 (1) 3-9.
- Carreras, B. 2003. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario, Tesis en opción al título de Maestro en Microbiología General, Universidad de La Habana.
- Carreras, B.; Rodríguez, S.; Ancheta O.; Valdés, T. y Harvey, Y. (2008). La morfología de los cuerpos parasporales y su relación con la actividad biológica en cepas cubanas de *Bacillus thuringiensis*, Revista CENIC Ciencias Biológicas, Vol. 39, No. 2.
- Cerón, J.; Covarrubias, L.; Quintero, R.; Ortiz, A.; Ortiz, M. y Aranda, E. (1994). PCR analysis of The *cryI* insecticidal crystal family genes from *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 60:353-356.
- Cerón, J., A. Ortiz, R. Quintero, L. Guereca, and A. Bravo. (1995). Specific PCR primers direct to identify, *cryI* and *cryIII* genes within a *Bacillus*



- thuringiensis* strain collection. Applied Environmental Microbiology 61:3826-3831.
- Crickmore N (2014). [http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil\\_Crickmore/](http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/)
- Del Rincón-Castro, M. C.; J. Méndez-Lozano; J. E. Ibarra. (2006). Caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* con actividad insecticida hacia el gusano cogollero del maíz (*Spodoptera frugiperda*) In Baró y otros 192 /fitosanidad (Lepidoptera: Noctuidae), Folia Entomológica. México. 45 (2):157-164, México.
- Falcón, A. (2005). *Bacillus thuringiensis* y *Beauveria bassiana* como alternativas para el manejo de *Plutella xylostella* (L.) (Lepidoptera : Noctuideae), tesis de grado: Ingeniero Agrónomo. No Publicada. UCLA Decanato de Agronomía. Venezuela.
- Glare, T R, O'Callaghan M. (2000). *Bacillus thuringiensis*: Biology, Ecology and Safety. West Sussex, UK: John Wiley and Sons, Ltd;. p. 350p
- Goyo, Y. (2005). Evaluación de *Bacillus thuringiensis* para el control *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) y su relación con la incidencia de *Fusarium moniliforme* en maíz (*Zea mays*L.). Tesis de Maestría UCLA- Agronomía, Posgrado Fitopatología. Venezuela
- Gitahy, P. ;Teixeira de Souza, M.; Monnerat R.; Arrigoni, E. J y Baldani, J. (2007). A Brazilian *Bacillus thuringiensis* Strain highly Active to Sugarcane Borer *Diatraea saccharalis* Lepidoptera: Crambidae), Brazilian Journal. Microbiology 38:531-537.
- Lacey L., Kroschel, J.; Arthurs, S. y De La Rosa, F. (2010). Control microbiano de la palomilla de la papa *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae), Rev. Colomb.Entomol.vol.36 no.2 Bogotá July/Dec.
- López, J. E. (1993). Selección y caracterización de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas a la palomilla dorso de diamante *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) Tesis Maestro en ciencias. CIEAIPN-UI. Irapuato. México. 130 pp.
- Macintosh, S.; Kishore, G.; Perlak, F.; Marrone, P.; Stone, T.; Sims, S.; Fuchs, R. (1990). Potentiation of *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity by serine protease inhibitors. Journal Agricultural Food Chemistry 38:11451152.



- Niedmann, L.; L.; Meza-Basso, L. (2006). Evaluación de Cepas Nativas de *Bacillus thuringiensis* como Alternativa de Manejo Integrado de la Polilla del Tomate *Tuta absoluta* Meyrick; Lepidoptera: Gelechiidae en Chile. *Agricultura Técnica*. 66 (3): 235-246
- Ojeda M., Pérez de Camacaro M., Rodríguez D., Gallardo M., y Valera R. (2010). Evaluación hortícola, producción y calidad postcosecha de clones avanzados de papa en la localidad de Duaca, Estado Lara, Venezuela. *Bioagro*, 22(1), 17-28.
- Porcar M y Juárez-Pérez V. Vargas. (2003). PCR-based identification of *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal genes. *FEMS Microbiol Rev* 2003; 26: 419-32.
- Ramos, F.; Carmona, A.; Béres M.; y Méndez N. (2004). Evaluación de Aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatraea Saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae) *Bioagro* v.16 n.3.
- Rondón, Silvia. 2010. The Potato Tuberworm. (2010). A Literature review of Its Biology, Ecology, and Control *Am. J. Pot Res* 87:149–166.
- Schnepf, E.; N: Crickmore; J. Van; D. Lereclus; J. Baum; J. Feitelson; D. Zeigler and H. Dean. (1998). *Bacillus thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*. Sept: 775-806.
- Tamez-G, P. Iracheta, M.; Pereyra B. Galán L. Gómez R., Tamez R, Rodríguez C. (2005). Caracterización de cepas Mexicanas de *Bacillus thuringiensis* tóxicas para larvas de lepidópteros y coleópteros. *Ciencia uanl / vol. viii, No. 4, Octubre-Diciembre*.