

Evaluación de la toxicidad de proteínas de *Bacillus thuringiensis* Berliner sobre el picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman

Evaluation of *Bacillus thuringiensis* Berliner proteins toxicity on cotton bollweevil *Anthonomus grandis* Boheman

Sylvia Gómez¹, Gustavo Díaz² y Víctor Manuel Núñez³

Resumen: El picudo del algodón, *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae), es considerado la principal plaga del cultivo de algodón en Colombia, no sólo por los daños económicos y sociales que causa, sino porque con sus apariciones tempranas altera e interrumpe el desarrollo de los programas de manejo integrado de plagas. La importancia de un manejo inteligente radica en el hecho de que este insecto se comporta como plaga 'clave', con una capacidad de daño en el cultivo entre 50% y 90%, si no se controla. En el presente estudio se estableció una metodología de bioensayo que determinó la actividad tóxica de proteínas cry3Aa y cry11a de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de primer instar de *A. grandis*. En los bioensayos se empleó una dieta artificial mezclada con los extractos bacterianos que contenían el complejo espóra-cristal de cada cepa. Los resultados indicaron que la cepa de referencia variedad *san diego* presentó toxicidad sobre larvas de primer instar de *A. grandis*, en condiciones de laboratorio, con una concentración letal 50 (CL₅₀) de 147,6143 µg de proteína total por mililitro de volumen final de dieta artificial, representando una alternativa potencial para el manejo de este insecto plaga del cultivo de algodón.

Palabras claves adicionales: control biológico de plagas, genes *cry*, coleóptero, bioensayo

Abstract: The cotton bollweevil, *Anthonomus grandis* (Coleoptera: Curculionidae), is considered one of the principal pests of cotton crop, not only for the economical and social damages, but also for its early appearance that interrupts the proper pest management. The importance of an intelligent control consist in the fact that this insect behaves a key pest with a damage capacity between 50-90% to the crop if not controlled. In the present study, it was established a bioassay to determine the toxic activity of the proteins cry3Aa and cry11a (produced by *Bacillus thuringiensis*) on bollweevil populations. For the bioassay, an artificial diet with bacterial extracts with-complex spore-crystal was used. The results showed that the strain var. *san diego* was toxic to the larvae at the first instar under laboratory conditions, using a lethal concentration of 50 (CL₅₀) equivalent to 147.6143 µg total protein per mL in the final volume of the artificial diet. Therefore, this result suggests a potential alternative for the control of this pest of cotton culture.

Additional key words: pest biological control, *cry* genes, coleoptera, bioassay

Introducción

BACILLUS THURINGIENSIS ES UNA BACTERIA gram positiva esporulada, nativa del suelo, caracterizada por producir

inclusiones paraesporales de constitución proteína (ICP), también denominadas δ-endotoxinas, con actividad tóxica sobre algunas especies de insectos de los órdenes Lepidoptera, Diptera, Coleoptera Hymenoptera,

Fecha de recepción: 04 de mayo de 2005
Aceptado para publicación: 30 de noviembre de 2006

¹ Investigadora, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Colombia). e-mail: rosygomez@yahoo.com

² Investigador, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Colombia). e-mail: gedm23@gmail.com

³ Investigador, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica), Centro de Investigación Tibaitatá, Mosquera (Colombia). e-mail: vinuza@yahoo.com

Homoptera, Orthoptera y Mallophaga y contra otros organismos, como ácaros, nematodos y platelmintos (Feitelson *et al.*, 1992). Desde su descubrimiento en el siglo pasado, *B. thuringiensis* se ha convertido en el entomopatógeno más utilizado a nivel mundial, con ventas que representan más de 90% del mercado de biopláglidas, y además es aprovechado para obtener plantas resistentes a insectos (Schnepf *et al.*, 1998).

Hasta la fecha, entre la extensa lista de proteínas cry conocidas, varias se han reportado por mostrar actividad tóxica contra insectos coleópteros. Sharpe (1976) reportó que la ICPS de *B. thuringiensis* var. *galleriae* NRRL B-4027 fue tóxica al escarabajo japonés *Popillia japonica*. Más tarde, Krieg *et al.* (1983) describieron la primera cepa productora de proteína cry3 con actividad contra el escarabajo colorado de la papa, *Leptinotarsa decemlineata*.

Posteriormente se han presentado nuevos reportes de cepas y/o variedades de *B. thuringiensis* que expresan proteínas con actividad contra coleópteros: la cepa EG2158 y la variedad *krustaki*, con actividad contra *L. decemlineata* (Donovan *et al.*, 1988; Lambert *et al.*, 1992) y las proteínas cry3Aa y cry3Ca, respectivamente; la cepa que contiene la toxina cry3Bb, con actividad para *Diabrotica undecimpunctata* (Sick *et al.*, 1990); la variedad *israeliensis* con toxicidad a *Hypothenemus hampei* (Méndez-López *et al.*, 2003); las cepas con las proteínas tóxicas cry8C y cry8D y actividad contra *Anomala cuerea* (Hori *et al.*, 1994; Asano *et al.*, 2003); la cepa con la proteína cry18Aa, con actividad contra *Melolontha melolontha* (Zhang *et al.*, 1997); las cepas con las toxinas cry34 y cry35, con actividad contra *Diabrotica virgifera* (Ellis *et al.*, 2002) y cepas con proteínas cry7Ab, cry8Aa, cry9Da, con actividad hacia otros coleópteros (Monnerat y Bravo, 2000; Wasano y Ohba, 1998).

También apareció el grupo de proteínas con actividad tóxica dual contra lepidóptero y coleóptero, como las cry11a, cry1b, cry2 y cry7Aa (Tailor *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1995; Botelho *et al.*, 2004 y Lambert *et al.*, 1992, respectivamente), con actividad hacia himenóptero y coleóptero (cry5Ba), contra dípteros y coleópteros (cry14Aa) y contra coleóptero y afidos (cry8Aa) (Monnerat y Bravo, 2000).

A. grandis Boheman, llamado comúnmente picudo del algodón, es una plaga perteneciente al orden Coleoptera que ataca botones, flores y cápsulas; los daños más notorios resultan del proceso de alimentación y/o reproducción del insecto, ocasionando la disminución notoria

de la producción por la caída de los botones florales y la reducción del número de capullos al momento de la cosecha. En las áreas no tratadas, las pérdidas varían de 50% a 90% (Lobatón y García, 1993; Manessi, 1997).

El control de esta plaga se ha realizado de forma cultural, legal, etológica, fisiológica y química, siendo ésta la más utilizada. No existe un método de control biológico efectivo en ninguno de los países donde se ha registrado esta plaga (Gómez *et al.*, 2000). Hasta la fecha, sólo un grupo brasilero ha realizado trabajos utilizando cepas nativas de *B. thuringiensis* contra *A. grandis*, obteniendo una CL_{50} de $1,8 \cdot 10^{-3}$ al utilizar el complejo espora-cristal (Botelho *et al.*, 2004). Según esto, es necesaria la exploración de este microorganismo como agente de control biológico para el insecto *A. grandis*.

En este trabajo se evaluó en forma rápida y efectiva la actividad insecticida de las proteínas cry3A y cry11a de las cepas de *B. thuringiensis* para ampliar las alternativas de control biológico sobre *A. grandis*, identificando la o las toxinas responsables del control de este insecto plaga.

Materiales y métodos

El trabajo se realizó en los laboratorios del Programa de recursos genéticos y mejoramiento vegetal de Corpoica, en el Centro de Investigación Tibaitatá de Mosquera, Cundinamarca.

Material entomológico

Se obtuvo mediante la cría del picudo del algodón, *A. grandis*, bajo condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C, 60 \pm 10% HR y 14 h-luz). Los insectos se alimentaron con la dieta artificial descrita por Monnerat *et al.* (2000).

El pie de cría se estableció a partir de insectos recolectados en la zona del Espinal (Tolima) y Montería (Córdoba) en estado de adulto, larva y pupa; éstos dos últimos, contenidos en botones. Los botones se almacenaron en recipientes plásticos con toallas de papel humedecidas hasta la salida de los adultos.

Los adultos se mantuvieron en recipientes plásticos de doble fondo: la dieta artificial se colocó en el piso superior del recipiente y los huevos se recolectaron en el fondo. Los huevos se pusieron en cajas de Petri que contenían la misma dieta artificial de los adultos, permitiendo que las larvas eclosionaran y se desarrollaran hasta convertirse en adultos; posteriormente, éstos se colectaron y se transfirieron a los recipientes plásticos de doble fondo para mantener el pie de cría.

Obtención de las proteínas

Las proteínas Cry evaluadas se obtuvieron de cepas de *B. thuringiensis* del Banco de microorganismo de Corpoica (tabla 1). Las cepas se cultivaron en medio agar LB a 28 °C por 7 d. La biomasa se recolectó y se resuspendió en agua para utilizarla en los bioensayos. La cantidad de proteína total presente en las muestras se cuantificó empleando la metodología descrita por Bradford (1976).

Tabla 1. Características generales de las cepas de *B. thuringiensis* empleadas en los bioensayos (Díaz, 2004).

Variación y/o cepa	Tamaño aproximado de cada banda (kDa)	Amplificación por PCR	Proteína
san diego	70 y 80	cry 3A	Cry3A
tenebrionis	70 y 80	cry 3A	Cry3A
kurstaki	70 y 80	cry 11a	Cry11a
3027	80	cry 11a	Cry11a
1710	70	cry 3A	Cry3A

Bioensayo

Un bioensayo selectivo fue realizado con cinco cepas de *B. thuringiensis* a una concentración de 152,125 µg de proteínas totales por mililitro de volumen final de dieta artificial, correspondientes a 700 µg · mL de proteínas totales, de acuerdo con la cuantificación según Bradford. Posteriormente se determinó la concentración letal 50 (CL₅₀) de la cepa escogida en el ensayo preliminar (tabla 2), utilizando cinco concentraciones seriadas.

Tabla 2. Conversión de la concentración de proteína total por mililitro, determinada por el método de Bradford, a mililitro de volumen final de dieta artificial con la cepa *B. thuringiensis* var. *san diego*.

Proteína total (µg · mL ⁻¹)	Concentración final de proteína por mililitro de volumen final de dieta artificial (µg · mL ⁻¹)
300	65,62
500	109,37
700	153,12
900	196,87
1100	240,62

En ambos ensayos se mezcló la dieta artificial (25 mL) con la suspensión bacteriana (7 mL) y se colocó en cajas de Petri con una altura de 0,7 cm. En cada caja se hi-

cieron 60 agujeros en los que se colocaron las larvas de primer instar, con ayuda de un pincel de pelo de marta de 0,01 mm y un estereoscopio. Las cajas de Petri con las larvas se llevaron al cuarto de cría y se tuvieron a las mismas condiciones ambientales de la cría.

La toxicidad se evaluó sobre un diseño completamente al azar. Se utilizaron por triplicado 20 larvas para cada tratamiento y se contempló un testigo tratado (dieta-larva y agua). La mortalidad de las larvas se evaluó con el estereoscopio, contando el número de larvas muertas –larvas que presentan inmovilidad y cambio de color– al quinto día del tratamiento .

Para el ensayo selectivo se realizó un análisis de varianza con los datos obtenidos, calculando los coeficientes de variación en cada ensayo y los porcentajes de mortalidad corregida según Abbot (Ciba-Geigy, 1978); los datos obtenidos en el segundo ensayo se sometieron a un análisis Probit (Finney, 1971) para determinar la CL₅₀.

Resultado y discusión

En los bioensayos con los extractos bacterianos que contenían el complejo espora-cristal de cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *A. grandis*, se observó que el porcentaje de mortalidad de las larvas utilizadas en el control negativo (agua) no fue mayor de 10%, mientras que para las cepa evaluadas estuvo entre 10% y 90%, con resultados positivos del bioensayo (Galán *et al.*, 1993). Los resultados del bioensayo selectivo se muestran en la figura 1. Al comparar el porcentaje de mortalidad corregida entre las cepas var. *kurstaki* (38,88%) y 3027 (33,3%), que expresan la proteína cry11a, no se encon-

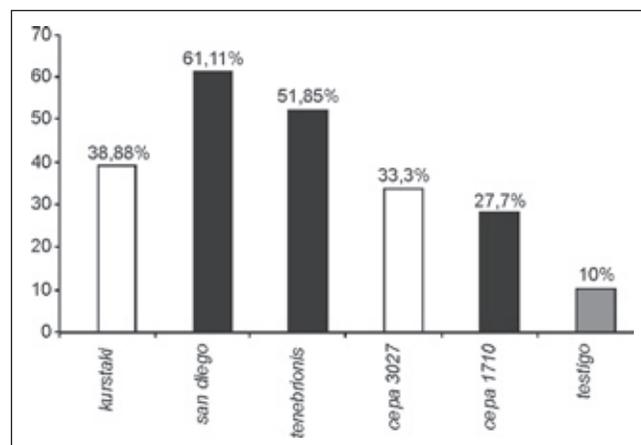


Figura 1. Evaluación de la mortalidad corregida de las cepas de *B. thuringiensis* sobre larvas de *A. grandis*, según Abbot (Ciba-Geigy, 1978).

traron diferencias estadísticas significativas, según la prueba de comparación múltiple (LSD) (tabla 3); pero sí se observaron diferencias significativas al comparar con las cepas que expresan la proteína cry3Aa. Esto podría deberse a que en las microvellosidades de la membrana del intestino de las larvas *A. grandis* hay más receptores para las proteínas cry3Aa que para las cry11a, teniendo en cuenta que en un mismo insecto pueden coexistir diferentes receptores (Gill y Pietrantonio, 1995) y/o a que el pH y las proteasas en el intestino de este insecto pudieron favorecer la solubilización y la mayor o mejor actividad proteolítica de la proteína cry3Aa (Carroll *et al.*, 1997; Rausell *et al.*, 2004).

Tabla 3. Análisis de varianza de las cepas de *B. thuringiensis*. Programa estadístico SAS. Variable dependiente: mortalidad.

Fuente	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	valor F	Pr > F
Tratamientos	5	222,666667	44,5333333	400,8	< 0,001
Error	12	0,3333333	0,1111111		
Total	17	224			

R	Coefficiente de varianza	Root MSE	Media mortalidad
0,993802	3,797468	0,333333	8,333333

Prueba de comparación múltiple según LSD

Prueba (LSD) para mortalidad

Agrupamiento por tratamiento	Repeticiones	Media	Tratamientos
A	3	13.0000	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>san diego</i>
B	3	11.3333	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>tenebrionis</i>
C	3	8.0000	<i>B. thuringiensis</i> , cepa 3027
C	3	9.0000	<i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i>
D	3	6.6666	<i>B. thuringiensis</i> , cepa 1710
E	3	2.0000	testigo absoluto

Las tres cepas seleccionadas que expresaron la proteína cry3Aa muestran diferencias estadísticas significativas entre ellas, según la prueba de comparación múltiple (LSD) (tabla 3), presentando el mayor porcentaje de mortalidad corregida la cepa variedad *san diego*, con 61,11%, seguida por la variedad *tenebrionis*, con 51,85%, y la cepa 1710, con 27,7%. Esto puede deberse a que la toxicidad depende no sólo de la actividad de la proteína cry sino también de las posibles interacciones con otras proteínas, las esporas producidas y otros factores de virulencia, como fosfolipasas, proteasas, quitinasas y VIP (Ellar *et al.*, 1996; Lereclus *et al.*, 1996).

Los resultados obtenidos en este estudio, permitieron seleccionar a la cepa *B. thuringiensis* var. *san diego* como la de mayor toxicidad sobre larvas de primer instar de *A. grandis*. Se diferencia de la cepa usada por Mateus (1998), con la que se encontró mayor mortalidad con la cepa var. *tenebrionis* para *Premnotrypes vorax* Hustache –también un coleóptero (Curculionidae)–; esto puede ocurrir porque los sitios de unión de las enzimas en una especie pueden no ser los mismos para la otra (Feitelson *et al.*, 1992) y porque existen diferencias en el ambiente del intestino de los insectos –pH y proteasas específicas– que influyen en la efectividad y especificidad de las toxinas (Koller *et al.*, 1992; Bradley *et al.*, 1995; Rausell *et al.*, 2004).

Para el segundo ensayo se escogió la cepa *B. thuringiensis* var. *san diego* por mostrar mayor toxicidad sobre larvas de primer instar de *A. grandis*, y se le determinó la CL₅₀ (tabla 4).

Tabla 4. Determinación de la concentración letal media (CL₅₀) de la cepa var. *san diego*, según el programa estadístico Probit.

Concentración letal	Concentración de proteína por mililitro de volumen de dieta artificial (µg · mL ⁻¹)
CL ₁₀	19,30167
CL ₅₀	147,6143
CL ₉₀	1128,91688

Como se observa en la tabla 4, las tres primeras concentraciones presentaron una tendencia a aumentar la mortalidad de las larvas, pero a concentraciones mayores de 153,125 µg de proteína final por mililitro de volumen final de dieta artificial la mortalidad tiende a disminuir; esto se podría comparar con el modelo enzima-sustrato, que es también una unión específica y estable. Cuando hay un exceso de enzima, los sitios de unión se saturan, causando un efecto inhibitorio por competencia de estos sitios y llevando a la caída de la actividad. Este mecanismo de unión e inhibición se podría extrapolar a la unión receptor δ-endotoxina, lo que explicaría la baja de toxicidad cuando se pasa del umbral de actividad máxima (Lehninger *et al.*, 1993).

Al comparar los resultados de este trabajo, en el que se determinó la toxicidad de las proteínas cry3Aa y cry11a, con los de Botelho *et al.* (2004), realizado con las proteínas cry2 y cry1B y con una CL₅₀ de 1,8 · 10⁻³ para una cepa nativa brasilera sobre larvas de primer instar de *A. grandis*, se puede concluir que este insecto

muestra mayor susceptibilidad a estas últimas proteínas. Esta diferencia podría tener varias explicaciones: la utilización por parte de Botelho *et al.* (2004) del complejo espora-cristal concentró más el contenido de las proteínas insecticidas; la posible presencia de una mayor cantidad de receptores y/o la mejor solubilización y activación de las proteínas cry1B y cry2 en el ambiente del intestino del *A. grandis* (Gill y Pietrantonio, 1995; Bradley *et al.*, 1995).

Bradley *et al.* (1995) realizaron estudios con otras plagas pertenecientes al orden Coleoptera y encontraron que la proteína cry3A muestra mayor toxicidad para *Leptinotarsa decemlineata* que la cry1B, mientras que la cry1B es más activa para *Chrysomela scripta*. Todos estos estudios confirman la premisa de que hay que determinar la proteína cry de mayor toxicidad para cada insecto plaga, ya que la especificidad depende de los diferentes ambientes del intestino de los insectos y de las diferentes interacciones receptor-toxina.

Se puede concluir que entre las cepas de *B. thuringiensis* evaluadas que contienen los genes cry3A y cry11a, la cepa var. *san diego* representa una alternativa para el control de *A. grandis*. La metodología de bioensayo empleada en este trabajo puede ser utilizada para otras cepas de *B. thuringiensis* que presenten genes con actividad en coleópteros.

Agradecimientos

Al Banco de microorganismos de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) por el préstamo de las cepas de *B. thuringiensis* y al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología 'Francisco José de Caldas' (Colciencias) por la financiación de esta investigación.

Literatura citada

Asano, S., C. Yamashita, T. Iizuka, K. Takeuchi, S. Yamanaka, D. Cerf y T. Yamamoto. 2003. A strain of *Bacillus thuringiensis* sub. *galleriae* containing a novel cry8 gene highly toxic to *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae). *Biological Control* 28, 191-196.

Botelho, L., A. Cardozo, E. Soares, C. Brod, D. Gerheim, A. Menezes, R. Falcao y R. Gomes. 2004. Estirpes de *Bacillus thuringiensis* efctivas conatra insetos das ordens Lepidoptera, Coleoptera e Diptera. *Pesquisa Agropecuaria do Brasil* 39(1), 11-16.

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.

Bradley, D., M.A. Harkey, M-K. Kim, K.D. Biever y L.S. Bauer. 1995. The insecticidal cry1B crystal protein of *Bacillus thuringiensis*

ssp. thuringiensis has dual specificity to coleopteran and lepidopteran larvae. *J. Invertebr. Pathol.* 65, 162-173.

Carroll, J., D. Convents, J. Van Damme, J. Boets, J. Van Rie y D. Ellar. 1997. Intramolecular proteolytic cleavage of *Bacillus thuringiensis* cry3A δ endotoxin may facilitate its coleopteran toxicity. *J. Invertebr. Pathol.* 70, 41-49.

Ciba-Geigy. 1978. Manual de ensayos de campo. Cómo realizar un bioensayo. Bogotá. pp. 14-18.

Díaz, G. 2004. Caracterización bioquímica y molecular de cepas de *Bacillus thuringiensis* Berliner y evaluación biológica sobre larvas de *Anthonomus grandis* Boheman en laboratorio. Trabajo de grado. Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

Donovan, W. P., J.M. González, M.P. Gilbert y C. Dankocsik. 1988. Isolation and characterization of EG2158, a new strain of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopteran larvae and nucleotide sequence of the toxin gene. *Mol. Gen. Genet.* 214, 365-372.

Ellar, J. D. Merrick, J. Bone y P. Smith, P. 1996. Mosquitocidal activity of the cryic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *Aizawai*. *Appl. Environ. Microbiol.* 62(2), 680-684.

Ellis, R.T., B.A. Stockhoff, L. Stamp, H.E. Schnepf, G.E. Schwab, M. Knuth, J. Russell, G.A. Cardineau y K.E. Narva. 2002. Novel *Bacillus thuringiensis* binary insecticidal crystal proteins active on western corn rootworm, *Diabrotica virgifera virgifera* LeConte. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 1137-1145.

Feitelson, J., J. Payane y L. Kim. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10(3), 271-275.

Finney, D. 1971. Probit analysis. An statistical treatment of the sigmoid response curve. Cambridge University Press, London. pp. 70-79.

Galán, L., M. Badii, C. Rodríguez, K. Arévalo, B. Pereyra, M. Gómez y R. Mercado 1993. Biotecnología para la producción de bioinsecticidas microbianos centrada en *Bacillus thuringiensis*. Universidad Nacional Autónoma de México, México. 97 p.

Gill, S. y V. Pietrantonio. 1995. Mechanism of action of insecticidal *Bacillus thuringiensis* endotoxins. Department of Entomology, University of California. Aug 19. P19.

Gómez, R., A. Galindo, A. Mondragón y V. Lobatón. 2000. Plan nacional de exclusión, supresión y erradicación económica del picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae). Manejo integrado del algodón con énfasis en picudo. Boletín de Sanidad Vegetal N°10. División de sanidad vegetal, Unidad de proyectos de prevención, Instituto Colombiano Agropecuario (ICA).

Hori, H., K. Suzuki, M. Oginara, M. Himejima, L. Indrasith, M. Minami, S. Asano, R. Sato, M. Ohba, M. andy H. Iwahana. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar *japonensis* strain Buibui specific for scarabaeid beetles. *J. Appl. Bacteriol.* 76, 307-313.

Koller, C., L. Bauer, y R. Hollingworth. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. *san diego* native δ -endotoxin crystals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 184, 692-699.

Krieg, V., A. Huger, G. Langenbruch y W. Schnetter. 1983. *Bacillus thuringiensis* var. *tenebrionis*, a new pathotype effective against larvae of coleopteran. *Z. Angew. Entomol.* 96, 500-508.

Lambert, B., H. Hofte, K. Annys, S. Jansens, P. Soetaert y M. Peferoen. 1992. Novel *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein with a silent activity against coleopteran larvae. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2536-2542.

Lehninger, A., D. Nelson y M. Cox. 1993. Principles of biochemistry. 2nd edition. Woeth Publishers. New York.

- Lereclus, D., A. Delécluse y M. Lecadet. 1996. Diversity of *Bacillus thuringiensis* toxins and genes. En: Enstwestle, P.F., J.S. Cory, M.J. Bailey y S. Higgs (eds.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley & Sons Ltd. pp. 37-68.
- Lobatón, V. e I. García. 1993. Algunos aspectos de la biología del picudo del algodón *Anthonomus grandis* Boheman (Coleoptera: Curculionidae) En: Memorias xx Congreso Sociedad Colombiana de Entomología (Socolen). Julio 13-16, Cali (Colombia).
- Manessi, O. 1997. *Anthonomus grandis* Boheman, el picudo mexicano del algodón. Imprenta Macagno, Buenos Aires. pp. 113-136
- Mateus, A. 1998. Caracterización de aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis* y estandarización de un método para la evaluación de toxicidad sobre el insecto plaga *Premnotrypes vorax* Hustache. Tesis de maestría. Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
- Méndez-López, I., R. Basurto y J. Ibarra. 2003. *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* is highly toxic to the coffee berry borer, *Hypothenemus hampei* Ferr. (Coleoptera: Scolytidae). FEMS Microbiology Lett. 226, 73-77.
- Monnerat, R.S y A. Bravo. 2000. Proteínas bioinsecticidas produzidas pela bactéria *Bacillus thuringiensis*: modo de ação e resistência. pp. 163-200. En: Melo, I.S. y J.L. Azevedo (eds.). Controle biológico. Vol. 3. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) - Meio Ambiente.
- Monnerat, R., S. Dias, O. Oliveira-Neto, S. Nobre, J. Silva-Werneck y M. Grossi de Sa. 2000. Criação massal do bicudo do algodão *Anthonomus grandis* em laboratório. Comunicado técnico N° 46. Embrapa, Brasília. 14 p.
- Rausell, C., I. García-Robles, J. Sánchez, C. Muñoz-Garay, A. Martínez-Ramírez, M. Real y A. Bravo. 2004. Role of toxin activation on binding and pore formation activity of the *Bacillus thuringiensis* cry3 toxins in membranes of *Leptinotara decemlineata* (Say). Biochim. Biophys. Acta 1660, 99-105.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62, 775-806.
- Sharpe, E.S. 1976. Toxicity of the parasporal crystal of *Bacillus thuringiensis* to Japanese beetle larvae. J. Invertebr. Pathol. 27, 421-422.
- Sick, A., F.H. Gaertner y A. Wong. 1990. Nucleotide sequence of a coleopteran-active toxin gene from a new isolate of *Bacillus thuringiensis* subsp. *tolworthi*. Nucleic Acids Res. 18, 1305-1305.
- Taylor, R., J. Tippett, G. Gibb, S. Pells, D. Pike, L. Jordan y S. Ely. 1992. Identification and characterization of novel *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin entomocidal to coleopteran and lepidopteran larvae. Mol. Microbiol. 6(9),1211-1217.
- Wasano, N. y M. Ohba. 1998. Assignment of δ -endotoxin genes of the four Lepidoptera-specific *Bacillus thuringiensis* strain that produce spherical parasporal inclusions. Curr. Microbiol. 30, 408-411.
- Zhang, J., T.C. Hodgman, L. Krieger, W. Schmetter y H.V. Schairer. 1997. Cloning and analysis of the first cry gene from *Bacillus popilliae*. J. Bacteriol. 179, 4336-4341.