

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE PROTEÍNAS DE *Bacillus thuringiensis* Berliner HACIA EL GUSANO BLANCO DE LA PAPA *Premnotrypes Vorax* Hustache.

Bacillus thuringiensis Berliner proteins toxicity evaluation against andean Potato Weevil *Premnotrypes Vorax* Hustache

Wilson Martínez O, Jairo Cerón S.¹

RESUMEN

El presente estudio estableció una metodología de bioensayo para determinar la actividad tóxica que las proteínas patrón Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca y Cry7Aa de *B. thuringiensis* pudieran tener sobre larvas del gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache, plaga de gran importancia en las diferentes zonas productoras de papa en Colombia. Los bioensayos fueron realizados empleando papa como sustrato alimenticio en forma de tubérculos o como puré y las proteínas mencionadas se emplearon en forma de suspensión espora-cristal, solubilizadas y/o procesadas enzimáticamente. La metodología de bioensayo más adecuada consistió en cubos de tubérculos de papa impregnados superficialmente con las proteínas de *B. thuringiensis*. Aunque se observó una ligera mayor actividad de las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca esta no superó el 10%. No se obtuvo actividad tóxica de ninguna de las proteínas evaluadas cuando fueron procesadas con la enzima tripsina o solubilizadas a un pH de 4.1.

Los resultados indicaron que las proteínas Cry de Bt empleadas no presentan actividad tóxica significativa sobre larvas de *P. Vorax*. Se plantea la hipótesis que esto es debido a que las proteínas provienen de cepas aisladas en otras regiones del mundo; por lo tanto, nuevos estudios al respecto deberán evaluar proteínas producidas por cepas nativas aisladas de áreas de cultivo donde *P. vorax* se presente como plaga de forma natural.

Palabras Claves: proteínas cry, control biológico de plagas, coleópteros, toxicidad.

SUMMARY

The present work established a bioassay methodology in order to determine *B. thuringiensis* Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb, Cry3Ca and Cry7Aa standard proteins toxicity against Andean potato weevil (*Premnotrypes vorax* Hustache). This insect is a very important pest in almost all potato fields in Colombia. Bioassays were done using natural diet as potato tuber pieces or potatoe

flour. Proteins were used as crystals, solubilized or enzymatically processed.

Best bioassay used potato pieces superficially contaminated with the respective *B. thuringiensis* proteins. Although some toxicity were observed with Cry3Aa and Cry3Ca proteins, mortality never was over 10%. All proteins were no toxic when tripsinated or solubilized at 4.1 pH. We concluded that Cry proteins evaluated have no toxicity against *P. vorax* larvae. We hypothesized it could be due to its foreign origin, so further studies should involve evaluation of proteins produced by native strains isolated from potato fields where *P. vorax* is naturally present.

Key words: cry proteins, biological control of pests, coleopteran, toxicity.

INTRODUCCION

Bacillus thuringiensis (Bt) es una bacteria entomopatógena que ha sido estudiada ampliamente desde su descubrimiento a principios del siglo pasado y se ha convertido en el agente de control biológico de plagas más empleado a nivel mundial (Galán et al, 1995). Bt es una bacteria que durante su esporulación produce una estructura cristalina compuesta por proteínas denominadas d-endotoxinas que poseen características insecticidas. En 1995 se propuso un sistema de clasificación de las proteínas Cry de acuerdo con la homología entre las secuencias nucleotídicas básicas de los genes *Cry* (Crickmore et al, 1998). Los estudios acerca de este microorganismo se han enfocado principalmente hacia cepas que producen proteínas tóxicas contra insectos plaga de los ordenes lepidoptera y diptera; mientras tanto, cepas con proteínas tóxicas hacia insectos del orden coleoptera solo se han estudiado en los últimos años (Keller et al, 1993; Glare et al, 2000). Krieg et al. (1983) reportaron en Alemania una subespecie de Bt denominada tenebrionis, que presentaba actividad insecticida contra el Escarabajo Colorado de la Papa *Leptinotarsa decemlineata*. Este hallazgo influyó mucho en los descubrimientos posteriores de cepas con actividad

¹ MSc Entomología y PhD Biotecnología, respectivamente. wilmarti@ibun.unal.edu.co - jaceron@ibun.unal.edu.co
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.

contra plagas del orden Coleoptera. Herrnstadt *et al.* (1986), reportaron el aislamiento de una cepa designada como M7 de Bt subsp *San diego* activa contra coleópteros.

Posteriormente se continuaron presentando nuevos reportes de cepas con actividad tóxica contra coleópteros como las cepas EG 2158 (Donovan *et al.*, 1988), EG 2838 y EG 4921 (Rupar *et al.*, 1991), Bt Subsp *japonensis* Subsp *buibui* (Hori *et al.*, 1992), Bt Subsp *donegani* (Cidaria *et al.*, 1990). Algunas subespecies de Bt como *thuringiensis*, *morrisoni*, *tolworthi*, *darmstadiensis* y *kumamotoensis* son activas contra insectos coleópteros debido al efecto de la b exotoxina que producen (Keller y Langenbruch, 1993), sin embargo, estos resultados pueden no ser importantes a nivel comercial por el efecto que puede causar esta toxina altamente estable, sobre otros organismos incluyendo el hombre.

El grupo de proteínas de *B. thuringiensis* activas contra coleópteros posee un rango de especies de insectos susceptibles bastante amplio, encontrándose especies pertenecientes a las familias Chrysomelidae, Coccinellidae, Scolytidae, Tenebrionidae, Scarabaeidae y Curculionidae, principalmente (Glare y O'callaghan, 2000).

Dentro de las subespecies de Bt tóxicas hacia coleópteros la más estudiada ha sido la subespecie *tenebrionis* con la cual se han realizado trabajos de caracterización morfológica, estructural, serológica, bioquímica y genética (Keller y Langenbruch, 1993). La primera caracterización de la estructura de una proteína del cristal insecticida de Bt se desarrolló en la subespecie *tenebrionis*, determinándose que la proteína Cry3A posee en su estructura tridimensional tres dominios estructurales con funciones específicas dentro del mecanismo de acción de dicha proteína (Li *et al.*, 1991).

Quiñones y Quintero (1996), hicieron un listado de las diferentes proteínas de Bt reportadas con actividad contra insectos coleópteros. Las proteínas Cry3, que poseen 4 holotipos diferentes Cry3Aa, Cry3Ba, Cry3Bb y Cry3Ca, producen protoxinas con pesos de 70 a 75 KDa y son procesadas a toxinas con pesos cercanos a 66 KDa. Las proteínas Cry7, con dos holotipos, Cry7Aa y Cry7Ab, con protoxinas de casi 130 KDa que son procesadas a toxinas de casi 66 KDa. Finalmente, mencionan las proteínas Cry8, con tres holotipos Cry8Aa, Cry8Ba y Cry8Ca.

Estas últimas tienen un peso de 130 a 134 KDa como protoxinas.

Las proteínas Cry3 y Cry7 se han empleado básicamente para el control de coleópteros comedores de follaje, pero aquellos insectos que tienen otro tipo de hábitos también pueden ser controlados (Suzuki *et al.*, 1994; Tapp y Stotzky, 1995).

En Colombia los productos a base de *B. thuringiensis* disponibles en el mercado únicamente controlan insectos plaga del orden lepidoptera. De acuerdo con esto es de gran relevancia la identificación de nuevas proteínas de *B. thuringiensis* que presenten actividad tóxica hacia insectos de otros ordenes taxonómicos y que sean plagas de importancia económica específicamente para Colombia como lo son varios insectos pertenecientes al orden coleoptera (Vélez, 1997).

El gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax* Hustache (Coleoptera: Curculionidae) es una plaga de gran importancia en Colombia, por varias razones: ha permanecido como plaga principal de este cultivo por más de 30 años, su control se realiza principalmente mediante el empleo de insecticidas químicos durante casi todo el desarrollo del cultivo y si no es controlada puede causar pérdidas hasta del 80% en la producción (Alvarado, 2000). En Colombia hasta el momento no existen reportes de otros grupos de investigación sobre evaluación de la toxicidad de proteínas de *B. thuringiensis* hacia el gusano blanco de la papa (Vélez, 1997); a nivel mundial existe solo un reporte de Gómez *et al.* (2000), quienes evaluaron la actividad insecticida de una proteína Cry3Aa recombinante hacia *P. vorax*, obteniendo una mortalidad promedio de larvas del 55%. De acuerdo con lo anterior se hace necesario la exploración de este microorganismo como agente de control biológico para este insecto plaga. Es así como en el presente estudio se evaluaron dos metodologías de bioensayo para determinar la toxicidad de algunas proteínas de *B. thuringiensis* sobre larvas del gusano blanco de la papa y así identificar su potencialidad de uso para el control de esta plaga presente en la mayoría de zonas productoras de este tubérculo en Colombia.

MATERIALES Y METODOS

El trabajo fue desarrollado en los laboratorios de entomología y biopesticidas del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia.

Material entomológico

El material biológico se obtuvo mediante cría del gusano blanco de la papa *P. vorax*, bajo condiciones de laboratorio (15 °C y 60% HR). El insecto se alimentó con dieta natural. Los insectos adultos se mantuvieron en recipientes plásticos en donde se colocaron tallos secos de gramíneas para proporcionar sitios de oviposición a las hembras (Valencia y Bohorquez, 1994). Los tallos secos con los huevos se ubicaron en recipientes plásticos con papel absorbente humedecido hasta la emergencia de las larvas. Una vez obtenidas las larvas de primer instar estas se utilizaron para el mantenimiento del pie de cría y para la realización de los bioensayos con las proteínas de *B. thuringiensis*.

Obtención de las proteínas

Las proteínas Cry evaluadas se obtuvieron de cepas patrón de *B. thuringiensis* del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia (Tabla 1). Las cepas fueron cultivadas en medio agar LB a 37°C hasta alcanzar un porcentaje de esporulación superior al 90%. La biomasa se recolectó y lavó con agua destilada-desionizada-estéril (DDE) y subsecuentes centrifugaciones para eliminar residuos del medio de cultivo. El material obtenido fue posteriormente liofilizado y almacenado hasta su uso.

Los bioensayos se realizaron empleando tanto proteína en forma de cristales (suspendida) como proteína en forma soluble y procesada enzimáticamente, para observar si existía algún efecto del procesamiento sobre la toxicidad de la misma (García et al, 2000, Koller et al, 1992, Lambert, 1992). Los ensayos con la proteína en suspensión se realizaron colocando una determinada cantidad de liofilizado en agua destilada y agitando el tiempo que fuera necesario hasta obtener una suspensión homogénea. Las proteínas empleadas en forma soluble fueron solubilizadas en dos condiciones diferentes, ácida (pH 4,1) y alcalina (pH10,0).

Para la solubilización a pH 4,1 se empleó una solución buffer universal. Para la solubilización a pH alcalino se empleó una solución buffer de carbonato de sodio. La solubilización se llevó a cabo para ambos tipos de buffer a 37°C, durante 3 horas en agitación constante. Una vez solubilizado el material, se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante obtenido, que corresponde a la proteína soluble se dividió en alícuotas y se almacenó a 0°C.

Para la realización de los ensayos con proteína procesada, se obtuvo el fragmento tóxico de la proteína procesandola con tripsina (Tipo II de páncreas porcino). Se empleó una proporción enzima: protoxina que osciló entre 2:1 y 10:1 con incubación por 12 horas a 37°C, tomando alícuotas a diferentes tiempos para determinar la cinética del procesamiento de cada una de las proteínas. Se corroboró el procesamiento total de las proteínas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 9%.

La cantidad de proteína total presente en las muestras empleadas para los bioensayos se cuantificó empleando la metodología de Lowry (Bollag, 1991).

Tabla 1. Características generales de las cepas de *B. thuringiensis* empleadas en los bioensayos. Pesos aproximados de las proteínas según Quiñones y Quintero (1996).

CEPA	GENES	PROTEINA	PESO MOLECULAR (Kda)	
			PROTOXINA	TOXINA
3Aa	<i>cry3Aa</i>	Cry3Aa	70 – 75	66
3Ba	<i>cry3Ba</i>	Cry3Ba	70 – 75	66
3Bb	<i>cry3Bb</i>	Cry3Bb	70 – 75	66
3Ca	<i>cry3Ca</i>	Cry3Ca	70 - 75	66
7Aa	<i>cry7Aa</i>	Cry7Aa	130	66

Métodos de bioensayo

Los bioensayos se realizaron con dos metodologías diferentes. La primera consistió en el empleo de cubos de tubérculos de papa de 0,25cm³, a los cuales se les aplicó la proteína de *B. thuringiensis* sobre la superficie. Los cubos de papa se dejaron secar al ambiente y posteriormente se colocaron en placas para cultivo de células de 24 pozos. Se infestó cada cubo con una larva de primer instar de *P. vorax*.

Las placas se sellaron, taparon y se incubaron por 7 días hasta la lectura del ensayo. En la segunda metodología se utilizó 1 gramo de harina de papa el cual se mezcló con 2 ml de la muestra y se colocó en vasos desechables. Posteriormente se colocaron 24 larvas de primer instar de

P. vorax por vaso. Las larvas permanecieron por 24 horas en la dieta, tiempo en el cual fueron trasladadas a trozos de papa sin tratar. La lectura del bioensayo se realizó a los 7 días.

En los bioensayos se empleó una dosis de 10 ug de proteína/cm² de dieta, para la primera metodología y 500 ug de proteína/ml para la segunda. Se utilizó en los ensayos con proteína suspendida un testigo absoluto con el agua destilada empleada en los tratamientos y en los bioensayos con proteína solubilizada testigos relativos con las soluciones buffer empleadas en la solubilización de las proteínas. El diseño experimental empleado fue completamente al azar con tres repeticiones, empleando 24 larvas por repetición. Los ensayos se hicieron por triplicado. La variable respuesta fue el número de larvas muertas por tratamiento. Se realizó análisis de varianza

con los datos obtenidos y se calcularon los coeficientes de variación en cada tipo de ensayo.

RESULTADOS Y DISCUSION

En los bioensayos con proteína en suspensión empleando harina de papa (Tabla 2), se observaron diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 3). Se observó el mayor porcentaje de mortalidad de larvas de *P. vorax* con

las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca. El resto de las proteínas no presentaron actividad tóxica y el testigo tampoco presentó mortalidad. Cuando se emplearon las proteínas en forma soluble para el bioensayo, el buffer empleado en el proceso de solubilización de las mismas, causó alteración de las características físicas de la dieta, originando mortalidades altas en todos los tratamientos incluyendo el testigo, por lo cual los datos de mortalidad obtenidos en dicho bioensayo no se tuvieron en cuenta para los análisis de toxicidad.

Tabla 2. Porcentajes de mortalidad promedio de los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax* empleando harina de papa. Concentración en proteína total 500 ug/ml.

	Proteína soluble		Proteína Suspendida
	pH 4.1	pH 10.0	
Testigo	41,66	47,22	0,00
Cry3Aa	59,72	26,38	6,94
Cry3Ba	59,72	6,94	0,00
Cry3Bb	45,83	41,66	0,00
Cry3Ca	56,94	38,88	6,94
Cry7Aa	61,11	62,50	0,00

Tabla 3. Análisis de varianza de los datos obtenidos en el bioensayo con harina de papa y proteína suspendida

FV	GL	SC	CM	F
Tratamientos	5	1,409	0,281	4,423*
Error	12	0,764	0,063	
Total	17	2,174		
C.V.: 21.08				

Respecto de los bioensayos empleando cubos de tubérculo de papa (Tabla 4), se observaron diferencias altamente significativas entre los tratamientos cuando se empleó la proteína suspendida (Tabla 5), siendo nuevamente las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca las que

presentaron mayor mortalidad. Hubo diferencias significativas (Tabla 5), cuando se emplearon las proteínas solubilizándolas previamente a pH 10, pero en este caso las proteínas Cry3Aa y Cry7Aa presentaron los mayores porcentajes de mortalidad.

Tabla 4. Porcentajes de mortalidad promedio de los bioensayos con larvas de primer instar de *P. vorax* empleando cubos de papa. Concentración de proteína total 10 ug/cm².

	Proteína soluble		Proteína suspendida	Proteína Tripsinada
	pH 4,1	pH 10,0		
Testigo	0,00	4,16	0,00	0,00
Cry3Aa	0,00	9,72	5,55	0,00
Cry3Ba	0,00	8,33	4,16	0,00
Cry3Bb	0,00	833	4,16	0,00
Cry3Ca	0,00	4,16	5,55	0,00
Cry7Aa	0,00	9,72	2,77	0,00

Tabla 5. Análisis de varianza de los datos obtenidos en los bioensayos con cubos de papa con proteína suspendida (arriba) y soluble a pH 10 (abajo).

FV	GL	SC	CM	F
Tratamientos	5	0,580	0,116	5,599**
Error	12	0,249	0,020	
Total	17	0,830		
C.V. : 10.61				

FV	GL	SC	CM	F-
Tratamientos	5	0,543	0,108	4,866*
Error	12	0,267	0,022	
Total	17	0,811		
C.V. : 9.03				

A pesar de esto, los porcentajes de mortalidad obtenidos fueron muy bajos en todos los casos (menor al 10%). Cuando las proteínas fueron solubilizadas a pH 4.1 la actividad tóxica fue nula para todas ellas, al igual que cuando fueron procesadas con tripsina.

En general, en bioensayos para evaluar la toxicidad de proteínas de *B. thuringiensis* con coleópteros se emplean dosis mayores a las que se emplean con insectos lepidópteros. En lepidópteros generalmente se emplean dosis en valores de nanogramos de proteína mientras que con coleópteros las dosis alcanzan valores de micro o miligramos de proteína (McIntosh et al, 1990; De León et al, 1995). De acuerdo con esto, las dosis de 10 mg/cm² y 500 mg/ml buscaban mostrar claramente si una cepa era activa o no y los porcentajes de mortalidad obtenidos deberían ser mayores del 50%. En vista de que se emplearon dosis altas con las proteínas en diferentes presentaciones y los resultados obtenidos dieron valores de porcentajes de mortalidad que nunca superaron el 10%, se concluye que las proteínas evaluadas definitivamente no presentan actividad tóxica significativa contra larvas del gusano blanco de la papa. Nuestros resultados difieren de los resultados obtenidos por Gómez et al (2000), ya que ellos encontraron actividad tóxica con la proteína Cry3Aa. Dichas diferencias son atribuibles a las diferentes metodologías de bioensayo utilizadas en ambos trabajos; adicionalmente, se observa que la dieta artificial que ellos emplearon originó una mortalidad en el testigo del 15%, la cual supera al máximo permisible para los bioensayos en laboratorio, que es del 10% (Lecuona, 1996). Dicha mortalidad obviamente afecta considerablemente las mortalidades obtenidas en los tratamientos.

En el presente trabajo la mortalidad del testigo nunca superó el 5% para los bioensayos con tubérculos de papa que fueron los empleados para los análisis finales.

Una característica importante de las proteínas de *Bacillus thuringiensis* es su alta especificidad hacia los insectos plagas que afecta. De acuerdo con esto y teniendo en cuenta los procesos coevolutivos entre los organismos, se puede pensar que aislamientos o cepas

nativas de *B. thuringiensis* obtenidos de ambientes en los cuales *P. vorax* se presenta como plaga natural podrían tener un mayor efecto tóxico sobre este insecto que las cepas patrón evaluadas en el presente trabajo, presentando posiblemente un mayor potencial para ser empleados en el control biológico del gusano blanco de la papa en Colombia.

Por otro lado, las proteínas solubilizadas o tripsinadas parece que estuvieron más expuestas a procesos de degradación e interferencia con la dieta empleada, lo cual explicaría la no toxicidad observada con las proteínas Cry3Aa y Cry3Ca en los bioensayos en que fueron empleadas de esta forma; se debería entonces emplear en ensayos posteriores proteína en forma de cristales para evitar dicho efecto.

Teniendo en cuenta los coeficientes de variación obtenidos en los bioensayos, los cuales no deben estar por encima de 15 (Gallegos, 1990; Lecuona, 1996), la metodología de bioensayo empleando harina de papa (C.V.:21,08) no sería adecuada ya que no garantiza una homogeneidad en el ensayo, probablemente debida a una distribución heterogénea de la proteína en la dieta cuando se mezcla con la harina de papa.

Mientras tanto, los bioensayos realizados empleando cubos de papa permiten una mayor homogeneidad en el ensayo (C.V.: 10,6 y 9,0) ya que se garantiza una mejor distribución de la muestra sobre la superficie de la dieta. De acuerdo con lo anterior y teniendo en cuenta que se presentan interferencias con la dieta especialmente cuando la proteína se ha solubilizado en soluciones buffer de pH extremos, es aconsejable entonces evaluar la toxicidad de proteínas de *B. thuringiensis* hacia el gusano blanco de la papa mediante bioensayos que empleen como dieta la papa en forma de tubérculo y no como harina.

Finalmente, vale la pena resaltar que la metodología de bioensayo planteada en este trabajo, también podría ser empleada en la evaluación de la toxicidad de proteínas de *B. thuringiensis* hacia otras plagas de importancia

económica con hábitos similares a *P. vorax* y que igualmente se alimenten del tubérculo de papa, como sería el caso de *Tecia solanivora* (Povolny) y *Pthorimaea operculella* (Zeller) (López, 2000).

LITERATURA CITADA

- ALVARADO, A. 2000. Almacenamiento tradicional de semilla de papa una fuente de infestación del gusano blanco de la papa *Premonotrypes vorax* Hustache en Boyacá. Serie Revista ventana al campo andino. 3 (1-2): 162.
- BOLLAG, D. & EDELSTEIN, S. 1991. Protein Methods. Wiley and Sons Inc. New York, USA. 250 p.
- CIDARIA, D.; CAPPAL, A.; CAPRIOLI, V. & PIRALI, G. 1990. *Bacillus thuringiensis* Var. donegani and preparation or toxin obtained therefrom, endowed with insecticidal activity against coleoptera. European Patent Application No 901147708.2.
- CRICKMORE, N.; ZEIGLER, D.; FEITELSON, J.; SCHNEPH, VANRIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J. & DEAN, D. 1998. Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(3): 807-813.
- DONOVAN W. P.; GONZALEZ J. M.; GILBERT M.P. & DANKOCSIK C. 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.
- DE LEON, T. & IBARRA, J. 1995. Alternative bioassay technique to measure activity of CryIII proteins of *Bacillus thuringiensis*. J. Econ. Entomol. 88(6): 1596-1601.
- GALAN, L.; LUNA, A. & MEDRANO, H. 1995. Tendencias mundiales en el uso de biopesticidas. Memorias del I Curso taller internacional: aislamiento, caracterización y producción de *Bacillus thuringiensis* para el control de plagas. Santafe de Bogotá (22 Ag-1 Sep 1995).
- GALLEGOS, G. 1990. Implementación de la concentración letal mínima como método para cuantificar la actividad de formulaciones de *Bacillus thuringiensis*. BIOTAM 2(1): 15-24.
- GARCIA, I.; SANCHEZ, J.; RAUSELL, C.; MARTINEZ, A.; DE MAAG, R.; REAL, M. & BRAVO, A. 2000. Specific binding and pore formation activity of Cry3A toxin in membranes isolated from *Leptinotarsa decemlineata* and *Tenebrio molito*. En: Society for invertebrate pathology XXXIII Meeting Program and abstracts. August 13-18. Guanajuato, Mexico. Pg. 33.
- GLARE, T. & O'CALLAGHAN, M. 2000. *Bacillus thuringiensis* : Biology, ecology and safety. John Wiley and Sons editores. West Sussex, UK. p. 211.
- GOMEZ, S.; MATEUS, A.; HERNANDEZ, J. & ZIMMERMANN, B. 2000. Recombinant Cry3Aa has insecticidal activity against the andean potatoe weevil, *Premonotrypes vorax*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 279(2): 653-656.
- HERRNSTADT, C.; SOARES, G.; WILCOX, E. & EDWARDS, D. 1986. A new strain of *Bacillus thuringiensis* toxin with activity against coleopteran insects. Bio/Technol. 4: 305-308.
- HORI, H.; SUZUKI, K.; OGINARA, M.; HIMEJIMA, M.; INDRASITH, L.; MINAMI, M.; ASANO, S.; SATO, R.; OHBA, M. & IWAHANA, H. 1994. Characterization of larvicidal toxin protein from *Bacillus thuringiensis* serovar japonensis strain Buihui specific for scarabaeid beetles. J. Appl. Bacteriol. 76: 307-313.
- KELLER, B. Langenbrunch, G. 1993. Control of coleopteran pests by *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis* An environmental biopesticide: Theory and Practice. Wiley and sons publishers. England.
- KOLLER, C.; BAUER, L. & HOLLINGWORTH, R. 1992. Characterization of the pH-mediated solubility of *Bacillus thuringiensis* var. san diego Native delta-endotoxin crystals. Bioch. and Biophys. Research Comm. 84 (2): 692- 699.
- KRIEG, V.; HUGER, A.; LANGENBRUCH, G. & SCHNETTER, W. 1983. *Bacillus thuringiensis* Var. tenebrionis, a new pathotype effective against larvae of coleoptera. Z. Angew. Entomol. 96: 500-508.
- LAMBERT, B.; HOFTE, H.; ANNYS, K.; JANSEN, S.; SOETAERT, J. & PERFEROEN, M. 1992. Novel *B. thuringiensis* insecticidal cristal protein with a silent activity against coleopteran larvae. Appl. Environ. Microbiol. 58 (8): 2536- 2542.
- LECUONA, R. 1996. Microorganismos patógenos empleados en el control microbiano de insectos plagas. Buenos Aires. 338 p.
- LI, J.; CARROL, J. & ELLAR, D. 1991. Crystal structure of insecticidal delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 angstrom resolution. Nature, 353.
- LOPEZ, A. 2000. Insectos plagas del cultivo de la papa en Colombia y su manejo. Serie Revista Ventana al Campo Andino. 3(1-2): 162.

- MACINTOSH, S.; STONE, T.; SIMS, S.; HUNST, P.; GREENPLATE, J.; MARRONE, P.; PERLAK, F.; FISCHHOFF, D. & FUCHS, R. 1990. Specificity and efficacy of purified *Bacillus thuringiensis* proteins against agronomically important insects. *J. Invertebr. Pathol.* 56: 258-266.
- QUIÑONES, L. & QUINTERO, R. 1996. Mecanismo molecular de acción de las delta-endotoxinas de *Bacillus thuringiensis*. En: Avances recientes en la biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey, México. p. 63-112.
- RUPAR, M.; DONOVAN, W.; GENE, R.; SLANEY, A.; MATTISON, J.; JOHNSON, T.; CHARLES, J.; COSMAO, V. & DE BARJC, H. 1991. Two novel strains of *Bacillus thuringiensis* toxic to coleopterans. *Appl. Environ. Microbiol.* 57(11), 3337-3344.
- SUZUKI, N.; HORI, H.; TACHIBANA, M. & ASANO, S. 1994. *Bacillus thuringiensis* strain Buibui for control of cupreous chafer *Anomala cuprea* (Coleoptera: Scarabaeidae), in turfgrass and sweet potato. *Biological Control: Theory and Applications in Pest Management* 4(4): 361-365.
- TAPP, H. & STOTZKY, G. 1995. Insecticidal activity of the toxins from *Bacillus thuringiensis* subspecies *kurstaki* and *tenebrionis* adsorbed and bounded on pure and soil clays. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(5):1786-1790.
- VALENCIA, L. & BOHORQUEZ, C. 1994. Oviposición del gusano blanco de la papa, *Premnotrypes vorax* (Hustache) (Coleoptera: curculionidae). *Rev. Col. Entom.* 20(3):165-167.
- VELEZ, R. 1997. Plagas agrícolas de impacto económico en Colombia: bionomía y manejo integrado. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia. 482 p.