

Actividad insecticida y fijadora de nitrógeno de la bacteria transformada *Paenibacillus polymyxa* que expresa Cry1C

Insecticidal and nitrogen fixation activities of the transformed *Paenibacillus polymyxa* expressing Cry1C

AMAL IBRAHIM HUSSEIN^{1,2}, NAHED IBRAHIM ABD EL-GHAFFAR^{3,4}, ADEL EL-SAYED HATEM^{2,3}, HANI K. ALDEBIS^{2,3} y ENRIQUE VARGAS-OSUNA^{2,3}

Resumen: Se realizaron ensayos de laboratorio con el objeto de conocer la posibilidad de utilización de la bacteria *Paenibacillus polymyxa* modificada genéticamente para expresar la toxina Cry1C de *Bacillus thuringiensis* como un sistema de aplicación de proteínas Cry para el control del noctuido *Spodoptera littoralis* en cultivos de algodón. Se ha estudiado la actividad insecticida en larvas de primer estadio de *S. littoralis* y la persistencia de la cepa de *P. polymyxa* transformada, en comparación con la misma cepa no modificada y con *B. thuringiensis* var. *aizawai* que expresa de forma natural la toxina. Los resultados muestran que la bacteria transformada tiene una mayor toxicidad ($CL_{50}=7,04 \times 10^7$ espora+cristal/ml) que *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($CL_{50}=8,47 \times 10^7$ espora+cristal/ml). Se encontraron altos niveles de supervivencia de la bacteria en el interior de los tejidos foliares y actividad insecticida al menos hasta 720 horas después del tratamiento foliar. Por otro lado, su aplicación en la planta aumenta la cantidad de Nitrógeno y en el suelo mejora la actividad nitrogenasa, en comparación con *P. polymyxa* no transformada.

Palabras clave: Algodón. *Bacillus thuringiensis*. Persistencia. *Spodoptera littoralis*. Toxicidad.

Abstract: Laboratory tests have been conducted in order to ascertain the possibility of using the bacteria *Paenibacillus polymyxa* expressing the *Bacillus thuringiensis* Cry1C toxin as a delivery system for Cry proteins that can be used to control the *Spodoptera littoralis* noctuid on cotton crops. We have studied the insecticidal activity on first instar larvae of *S. littoralis* and the persistence of the transformed strain of *P. polymyxa*, compared with the unmodified strain and *B. thuringiensis* var. *aizawai* naturally expressing the toxin. The results show that the transformed bacteria was more toxic ($LC_{50}=7.04 \times 10^7$ spore+crystal/ml) than *B. thuringiensis* var. *aizawai* ($LC_{50}=8.47 \times 10^7$ spore+crystal/ml). High levels of persistence into foliar tissues and insecticide activity were found, at least until 720 hours after foliar treatment. On the other hand, its application in the plant increases the amount of nitrogen and improves soil nitrogenase activity compared to untransformed *P. polymyxa*.

Key words: Cotton. *Bacillus thuringiensis*. Persistence. *Spodoptera littoralis*. Toxicity.

Introducción

Bacillus thuringiensis (Berliner, 1915) (Bt) es una bacteria Gram-Positivo que se caracteriza por producir una inclusión parasporal durante la esporulación formada por uno o más cuerpos cristalinos que contienen las proteínas insecticidas (Höfte y Whiteley 1989; Schnepf *et al.* 1998). Estas proteínas, llamadas delta-endotoxinas o Cry, son tóxicas para insectos de los órdenes Lepidoptera (Brock y Madigan 1988), Coleoptera (Dulmage y Aizawa 1982; Chiang *et al.* 1986) y Diptera (Lambert y Peferoen 1992) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido a nivel mundial (Brar *et al.* 2006).

Los avances en la genética de Bt permiten el desarrollo de su máxima potencialidad como insecticida mediante manipulación de genes *cry* (que codifican determinadas toxinas) con objeto de ampliar su espectro de actividad, aumentar su toxicidad mediante efectos sinérgicos o aditivos (Crickmore *et al.* 1995; Lee *et al.* 1996) o para la producción de organismos genéticamente modificados.

Un problema relacionado con los preparados comerciales a base de Bt es su limitada persistencia y estabilidad en campo (Cohen 1991) y para paliar este inconveniente se han puesto en práctica técnicas de inserción de genes *cry* específi-

cos en otros organismos con capacidad de colonizar la planta huésped del fitófago, de tal manera que los organismos transformados puedan sintetizar de forma continua cantidades suficientes de proteína Cry para evitar el daño causado por el insecto (Obukowicz *et al.* 1986; Gelernter 1990; Stock *et al.* 1990; Waalwijk *et al.* 1991; Lampel *et al.* 1994).

Sin embargo, la introducción de genes *cry* en bacterias distintas a *B. thuringiensis* acarrea inconvenientes debido a la inestabilidad de la característica introducida (Tiedje *et al.* 1989). La utilización de bacterias del mismo género que *Bt* permite solventar estos inconvenientes y reducir los problemas asociados a la expresión de los genes *cry* (Perlak *et al.* 1991; Fujimoto *et al.* 1993). Además, se ha visto que cepas transformadas de *Bacillus megaterium* de Bary, 1884; *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) y *Bacillus licheniforme* (Weigmann, 1898) que expresan proteínas Cry específicas de Bt pueden tener una persistencia prolongada y mejorar su eficacia insecticida (Bora *et al.* 1994; Theoduloz *et al.* 2003).

El lepidóptero *Spodoptera littoralis* (Boisduval, 1833) (Noctuidae), conocido comúnmente en España como "rosquilla negra", es una especie polífaga y de distribución mediterránea que causa daños de importancia económica en numerosos cultivos y plantas hortícolas. En Egipto es considerada como la plaga principal del cultivo de algodón (Hosny

¹ Becaria de Investigación. ² Departamento de Ciencias y Recursos Agrícolas y Forestales, Grupo de Entomología Agroforestal, ETSIAM, Universidad de Córdoba, Edificio Celestino Mutis, Campus Universitario de Rabanales, Crta. Madrid-Cádiz, km 396-a, 14071, Córdoba, España. z72ibiba@uco.es Autora para correspondencia. ³ Ph. D. ⁴ Department of Microbial Molecular Biology, Agricultural Genetic Engineering Research Institute (ARC), 9 Gamaa Street, 12619, Giza, Egypt.

et al. 1986; Hatem et al. 2009) y en España sus poblaciones son abundantes en las regiones del Levante y Andalucía (Gómez de Aizpurúa y Arroyo Varela 1994). Esta especie, como otras del mismo género, mostraron en principio poca susceptibilidad a los primeros productos comerciales de Bt, pero luego se han aislado cepas naturales pertenecientes a las variedades *entomocidus* y *aizawai* (Navon et al. 1983; Broza et al. 1984) con mayor capacidad tóxica para las larvas de estos noctuidos, y más recientemente se han obtenido cepas transformadas genéticamente que son más activas (Kalman et al. 1995). Se sabe que las especies de *Spodoptera* poseen en la membrana de las células columnares del mesenterón un receptor específico de la proteína Cry1C (Sanchis et al. 1994) responsable de esta mayor susceptibilidad.

A partir de la bacteria fijadora de Nitrógeno *Paenibacillus polymyxa* (Prazmowski, 1880) que habita la rizosfera del algodón, se ha construido una cepa (NMO10) que expresa la proteína Cry1C y que presenta toxicidad para larvas de *S. littoralis* (Ibrahim et al. 2006; Ibrahim y Omar 2009).

Este trabajo estudia la actividad insecticida y la persistencia de la bacteria *P. polymyxa* que expresa la toxina Cry1C de Bt, para conocer su idoneidad como un sistema de aplicación de toxinas Cry que pueda ser utilizado en aplicaciones foliares para el control de *S. littoralis* en el cultivo de algodón. Así mismo, se determina si esta bacteria transformada mantiene su capacidad fijadora de nitrógeno.

Materiales y Métodos

Material biológico. Se usaron *Paenibacillus polymyxa* transformada con cry1C de Bt, la cepa natural de *Paenibacillus polymyxa* (ambas obtenidas por la Dra. Nahed Abdel Al-Ghaffar Ibrahim del Agriculture Genetic Engineering Research Institute de Egipto) y *Bacillus thuringiensis* var. *aizawai* reaislado del producto comercial Xantari® GD: 15% (15 millones U.I./gr) p/p suministrado por Kenogard, S.A (Barcelona). La técnica de obtención de la cepa de *P. polymyxa* transformada ha sido descrita por Ibrahim et al. (2008) y el gen cry1C fue obtenido por el laboratorio del Dr. Donald H. Dean (Universidad de Ohio, USA).

Las bacterias se multiplicaron en medio de cultivo T3 [5g/l de peptona, 1,5g/l de extracto de levadura, 0,005g/l de MnCl₂ y solución tampón de fosfato sódico 0,5M (pH 6,8)] y para la bacteria transformada se añadió al medio kanamicina (100µg/ml). El periodo de incubación fue de siete días, tras lo cual se confirmó que los cultivos estaban completamente lisados y se procedió a la centrifugación a 10000rpm durante 15min a 4°C en tubos de polipropileno de 30ml. El sedimento se lavó en agua bidestilada y el precipitado final se obtuvo como una suspensión en agua estéril de espora-cristal que se conservó a -20°C hasta su uso. La riqueza de las suspensiones en número de esporas y cristales por ml (esp+cri/ml), se determinó mediante recuentos en cámara Neubauer.

Las larvas de *S. littoralis* proceden de una población mantenida en condiciones de insectario (26±2°C, 60±5% HR y fotoperiodo de 16 horas de luz) que fueron alimentadas con dieta semisintética a base de harina de alfalfa modificada de Poitout y Bues (1974).

Bioensayos de toxicidad. En estos bioensayos se comparó, en condiciones de insectario, la toxicidad de *P. polymyxa* transformada (Ppt) y de *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Bt) que contiene el gen cry1C de forma natural. Se emplearon

cinco concentraciones de Ppt, seis concentraciones de Bt y un testigo para cada tipo de bacteria, utilizando 10 larvas de primer estadio (L1) por repetición, con cinco repeticiones para Ppt siendo necesario un mayor número de repeticiones (10) para Bt con el fin de que el ajuste de la recta de regresión fuera estadísticamente aceptable. Las concentraciones de Ppt fueron 6,12x10⁶; 18,40x10⁶; 55,06x10⁶; 165,30x10⁶ y 495,90x10⁶ esp+cri/ml y las de Bt 0,68x10⁶; 2,10x10⁶; 6,16x10⁶; 18,47x10⁶; 55,40x10⁶ y 166,20x10⁶ esp+cri/ml.

El complejo espora-cristal se suministra a las larvas de *S. littoralis* depositando 200µl de la suspensión sobre dieta previamente vertida en el fondo de cajas de plástico de 39mm de diámetro y 25mm de altura. Después de dejar secar, se introducen 10 larvas neonatas por caja. La duración de bioensayo es de siete días.

Bioensayos de supervivencia y persistencia. Como inóculos se utilizaron las bacterias *P. polymyxa* transformada y *P. polymyxa* natural, que procedían de la multiplicación en medio T3 antes descrita y que posteriormente se liofilizaron hasta su uso. Los liofilizados se resuspendieron en agua hasta una concentración final de 1000ppm, a los que se añadió goma arábica (1%) y Tween-20 (0,01%). Estas suspensiones fueron aplicadas en pulverización foliar sobre plantas de algodón de cuatro semanas de edad mantenidas en condiciones de semicampo. Finalmente se dejaron secar 2 horas antes de iniciar la toma de muestras para los bioensayos. Para ello, en diferentes periodos después de la inoculación de las plantas (2, 4, 6, 8, 10, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 336, 504 y 720 horas) se eligieron al azar dos hojas, de las cuales una de ellas se usaron para la determinación de la supervivencia de la bacteria y la otra para el ensayo de persistencia de la actividad insecticida.

Para determinar la supervivencia de las bacterias en el interior de los tejidos foliares, tras su desinfección superficial con hipoclorito sódico al 10%, se cortaron en pequeños trozos que se sometieron a inmersión y agitación suave en 50ml de una solución estéril de MgSO₄ 100mM durante 15min para la liberación de la bacteria fijada al tejido. Con cada líquido resultante (suspensión madre) se hicieron tres diluciones (1/10, 1/100 y 1/1000) y cada suspensión fue cultivada en placa (2 placas/suspensión) con medio LB sólido (triptona 10g/l, levadura 5g/l, cloruro sódico 5g/l y agar 15g/l) y se incubaron a 30°C durante la noche. Finalmente se calculan las Unidades Formadoras de Colonias (UFC) como valor medio de los recuentos de las placas y se determinan los valores de UFC/g peso seco (Sudha et al. 1999).

Para evaluar la persistencia de la toxicidad de *P. polymyxa* transformada, las hojas de algodón seleccionadas se colocaron separadamente en una placa Petri (16cm de diámetro y 3,5cm de altura) en condiciones de insectario y se infestaron artificialmente con 10 larvas neonatas de *S. littoralis*. A las 72 horas se realizó el control de mortalidad larvaria. Para cada tiempo después de la aplicación se realizaron tres repeticiones, utilizando los valores medios de mortalidad para determinar la toxicidad correspondiente.

Contenido de nitrógeno en planta y actividad nitrogenasa en suelo. El nitrógeno total se determinó con plantas tratadas por pulverización foliar con 1000ppm de *P. polymyxa* transformada y de *P. polymyxa* natural. Dos semanas después de la inoculación se tomaron muestras de la parte epigea que se analizaron con el método Micro Kjeldahl, usando una mezcla

Tabla 1. Análisis de regresión Probit y CL_{50} de *Paenibacillus polymyxa* transformada (Ppt) y *Bacillus thuringiensis* var *aizawai* (Bt) para larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis*.

Bacteria	χ^2	g.l.	Recta de regresión	CL_{50} (esp+cri/ml)	Límites fiduciales 95%	
					Inferior	Superior
Ppt	1,28	3	$y = 1,83x + 1,62$	$7,04 \times 10^7$	$5,49 \times 10^7$	$9,09 \times 10^7$
Bt	9,46	4	$y = 1,06x + 2,96$	$8,47 \times 10^7$	$4,50 \times 10^7$	$24,01 \times 10^7$

χ^2 = test para la bondad del ajuste.

de $H_2SO_4 + HClO_3$ (1:1) de acuerdo al procedimiento de Page *et al.* (1982). El contenido de N se calculó mediante la fórmula: $mg\ N/planta = \%N \times Peso\ seco\ (g)/planta \times 10$.

Para ambas bacterias se determinó también la actividad nitrogenosa en muestras de suelo que fue artificialmente infestado con 1000ppm de *P. polymyxa* transformada y de *P. polymyxa* natural, siguiendo la técnica de reducción del acetileno (ARA) a partir de muestras de 100gr de suelo activado con dos fuentes de carbono e incubado a 28°C durante 72h. Las muestras se transfirieron a tubos de 300ml y se analizaron por cromatografía de gases según el método descrito por Hardy *et al.* (1973) y Somasegaran y Hoben (1985). A partir de las cantidades de etileno (en μ moles) de las muestras, se determinan los valores expresados en nanomoles de etileno/gr/h.

Análisis estadísticos. Los datos de mortalidad larvaria en los bioensayos de toxicidad se sometieron a análisis de regresión Probit (Finney 1971) para determinar las ecuaciones lineales que relacionan concentración-mortalidad y a partir de ellas se calcularon las concentraciones letales medias (CL_{50}). Para los análisis de regresión y la comparación de las rectas se utilizó el programa POLO (Russell *et al.* 1977). Los datos de cantidad de Nitrógeno y de actividad nitrogenosa fueron sometidos a análisis de la varianza y las medias se compararon con la prueba de la Mínima Diferencia Significativa (LSD) al 5% de significación.

Resultados y Discusión

Evaluación de la toxicidad. Se determinó la mortalidad de larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* tratadas con *P. polymyxa* transformada y *B. thuringiensis* var. *aizawai* (Tabla 1).

Los valores de la prueba χ^2 indican un buen ajuste de ambas rectas, cuyas pendientes difirieron entre sí (test de paralelismo $\chi^2(1)=14,87$ ($p<0,001$), siendo significativamente mayor la pendiente en el tratamiento con *P. polymyxa* transformada. Esta diferencia se atribuye a la menor heterogeneidad de la población de la bacteria transformada en comparación con la cepa de *B. thuringiensis*.

La toxicidad de *P. polymyxa* transformada se caracterizó por una CL_{50} de $7,04 \times 10^7$ esp+cri/ml para larvas de primer estadio de *S. littoralis*; este valor fue menor que el de *B. thuringiensis* var. *aizawai* de $8,47 \times 10^7$ esp+cri/ml. No obstante, como se deduce por el solape de los intervalos fiduciales, ambos valores no difirieron significativamente. A resultados similares llegaron Ibrahim y Omar (2009) al comparar la toxicidad de *P. polymyxa* transformada con *B. thuringiensis* var. *entomocidus* sobre larvas neonatas de *S. littoralis*.

Bora *et al.* (1994) utilizaron la cepa RS1 de *B. megaterium* aislada de la filósfera de las plantas de algodón para

introducir el gen *cryIAa* de la cepa HD-1 de *B. thuringiensis* var. *kurstaki*. La actividad insecticida del organismo transformado en larvas de *Helicoverpa armigera* (Hübner, 1805) fue similar a la cepa HD1 pero su efecto persistió durante más tiempo ofreciendo una mejor protección de las plantas. Así mismo, cepas transformadas de *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan CryIAb y habitan de forma natural en el filoplano de plantas del tomate, muestran una actividad insecticida contra el lepidóptero *Tuta absoluta* (Meyrich, 1917) similar a una cepa de *B. thuringiensis* que expresa de forma natural la proteína (Theodulos *et al.* 2003). La utilización de estas bacterias colonizadoras de plantas, transformadas genéticamente para tener acción insecticida contra plagas, se ha venido desarrollando desde la década de los 90 (Gelernter y Schwab 1993), sin que hasta ahora se hayan encontrado efectos ambientales adversos en la evaluación de su bioseguridad en campo.

Supervivencia de *P. polymyxa*. En las hojas superficialmente esterilizadas se encontraron altos niveles de supervivencia de la bacteria establecida en los tejidos foliares al menos hasta 720 horas después del tratamiento (Tabla 2). Los valores en UFC/g peso fresco mostraron oscilaciones entre periodos

Tabla 2. Supervivencia en el tejido foliar del algodón de *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y *Paenibacillus polymyxa* no transformada, después de pulverización foliar en plantas de algodón.

Horas después de tratamiento	<i>P. polymyxa</i> transformada UFC ($\times 10^3$)/g peso fresco	<i>P. polymyxa</i> UFC ($\times 10^3$)/g peso fresco
2	4,9	6,5
4	1,8	14,0
6	0,6	3,6
8	2,0	5,4
10	0,4	4,4
12	0,6	4,2
24	1,0	1,1
48	3,0	1,4
72	1,1	1,5
96	8,6	5,1
120	1,9	4,0
144	1,5	6,2
168	2,4	8,6
336	17,3	2,4
504	5,9	3,5
720	25,2	2,5

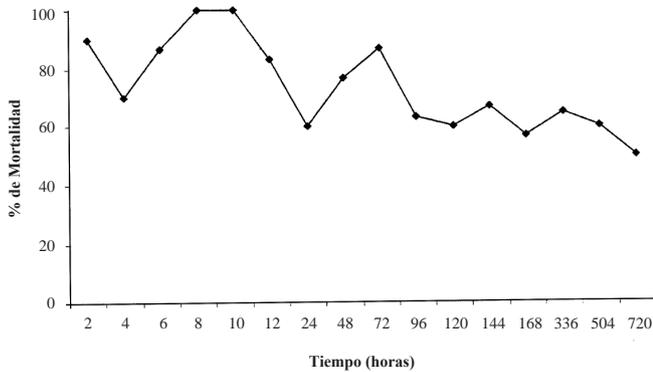


Figura 1. Persistencia de la actividad insecticida de *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*), sobre larvas de primer estadio de *Spodoptera littoralis* después de pulverización foliar en plantas de algodón.

consecutivos, probablemente debido a que las determinaciones procedían de una sola muestra de hoja. No obstante, la supervivencia de la bacteria transformada se extendió durante los 30 días de duración del ensayo, al igual que la bacteria no transformada. Resultados semejantes se han obtenido en caña de azúcar (James y Olivares 1998) y arroz (James *et al.* 2002). En cultivos en invernadero Denise *et al.* (2002) encuentran bacterias endófitas colonizando sus plantas huéspedes originales 42 días después de la inoculación a unos niveles de $3,5-7,7 \times 10^{10}$ UFC/g peso fresco.

Persistencia de la actividad insecticida. Los porcentajes de mortalidad oscilaron entre 46,7 y 100%, y al final del ensayo la media estuvo alrededor del 50% de las larvas tratadas (Fig. 1). Datos similares han sido señalados por Ibrahim *et al.* (2006) y Sudha *et al.* (1999) con el también lepidóptero *Scirpophaga incertulas* (Walker, 1863) en arroz. La cepa RS1 de *B. megaterium* transformada con el gen *cry1Aa* de *B. thuringiensis* var. *kurstaki* persiste en la superficie de las hojas de algodón durante más de 28 días, mientras que la cepa de *B. thuringiensis* desaparece completamente siete días después de la inoculación. La actividad insecticida de la cepa transformada en larvas de *H. armigera* persistió a altos niveles durante tres semanas desde la aplicación (Bora *et al.* 1994). Así mismo, cepas transformadas de *B. subtilis* y *B. licheniforme* que expresan Cry1Ab fueron capaces de sobrevivir en las hojas del tomate durante más de 45 días (Theoduloz *et al.* 2003).

Los resultados indican que la toxicidad de la bacteria permanece durante un largo periodo, en contraste con la pérdida mucho más rápida de actividad de las pulverizaciones con Bt convencional que se degrada significativamente en 24-48 horas (Pusztai *et al.* 1990). La mayor persistencia puede ser una cualidad como bioinsecticida cuando se tratan poblaciones larvianas heterogéneas, como las que suelen caracterizar los ataques de *S. littoralis*, aunque la presencia de residuos de bajas dosis en la planta pueden contribuir a la aparición de resistencia (Nester *et al.* 2002). En estas circunstancias, los enemigos naturales pueden influir también en el desarrollo de resistencia a la bacteria por preferir los intoxicados-susceptibles o los saludables-resistentes (Schnepf *et al.* 1998).

Contenido de Nitrógeno y actividad nitrogenasa. En las plantas tratadas con *P. polymyxa* transformada el contenido

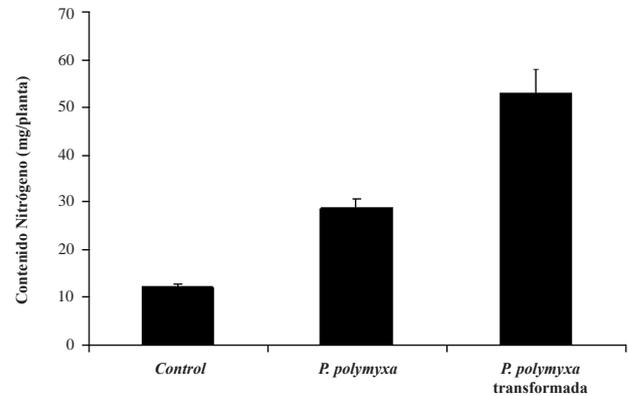


Figura 2. Contenido total de Nitrógeno en plantas de algodón tratadas en pulverización foliar con *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y no transformada.

medio de Nitrógeno fue de 52,93mg/planta, significativamente mayor ($F=34,5$; $gl=2$; $P=0,0005$) que el de 28,79mg en las tratadas con *P. polymyxa* no transformada (Fig. 2). En cuanto a la actividad nitrogenasa (ARA) (Fig. 3), se encontraron diferencias significativas entre tratamientos ($F=75,4$; $gl=2$; $P=0,0001$) de tal forma que en suelos con *P. polymyxa* transformada la actividad fue mayor que en suelos con *P. polymyxa* no transformada. Por tanto, en ambos casos la bacteria transformada mostró mayor actividad fijadora de Nitrógeno en las plantas de algodón que la propia bacteria no transformada, lo cual es un resultado no esperado cuyas causas han de ser investigadas. Gyaneshwar *et al.* (2001) detectaron también actividad nitrogenasa en plantas de arroz inoculadas con la bacteria fijadora de nitrógeno *Serratia marcescens* (Bizio, 1823).

En resumen, los resultados indican buenas aptitudes de la bacteria *P. polymyxa* que expresa la toxina Cry1C de *B. thuringiensis*, como bioinsecticida y que serviría también como biofertilizante en programas de Producción Integrada para el control de *S. littoralis*. Por un lado, la bacteria transformada tiene similar actividad tóxica que *B. thuringiensis* var. *aizawai* sobre larvas de primer estadio de *S. littoralis* y en pulverizaciones foliares presenta alta persistencia y supervivencia al mismo tiempo que favorece la capacidad fijadora de nitrógeno en la planta; por otro lado, su aplicación mejora

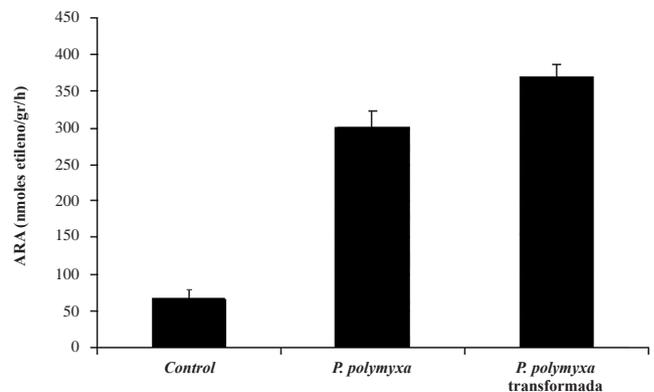


Figura 3. Actividad nitrogenasa en suelo tratado con *Paenibacillus polymyxa* transformada (con el gen *cry1C*) y no transformada.

la actividad nitrogenasa en suelo, en comparación con la bacteria *P. polymyxa* no transformada.

Agradecimientos

A la Agencia Española de Cooperación Internacional para el Desarrollo (AECID) por la concesión de una Beca de Doctorado al primer autor.

Literatura citada

- BORA, R.; MURTY, M.; SHENBARGARATHAI, R.; SEKAR, V. 1994. Introduction of Lepidopteran-specific insecticidal crystal protein gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* by conjugal transfer into a *Bacillus megaterium* strain that persists in the cotton phylloplane. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 214-22.
- BRAR, S.; VERMA, M.; TYAGI, R.; VALÉRO, J. 2006. Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides. *Process Biochemistry* 41: 323-342.
- BROCK, T. D.; MADIGAN, T. 1988. *Biology of microorganisms*. Prentice-Hall, Inc. Englewood, Cliffs. New Jersey. 835 p.
- BROZA, M.; SNEH, B.; YAWETZ, A.; ORON, U.; HONIGMAN, A. 1984. Commercial application of *Bacillus thuringiensis* var. *entomocidus* for the control of *Spodoptera littoralis* Boisduval. *Journal of Economic Entomology* 77: 1530-1533.
- CHIANG, A. S.; YEN, D. F.; PENG, W. K. 1986. Germination and proliferation of *Bacillus thuringiensis* in the gut of rice moth larva *Coryca cephalica*. *Journal of Invertebrate Pathology* 48: 96-99.
- COHEN, E.; ROZEN, H.; JOSEPH, T.; BRAUN, S.; MARGULIES, L. 1991. Photoprotection of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* from ultraviolet irradiation. *Journal of Invertebrate Pathology* 57: 343-351.
- CRICKMORE, N.; BONE, E.; WILLIAMS, J.; ELLAR, D. 1995. Contribution of the individual components of the δ -endotoxin crystal to the mosquitoicidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters* 131: 249-254.
- DENISE, K. Z.; PAT, N. B.; HARRIA, F.; ZHENGYA, K.; DANIEL, H.; PHYLLIS, I. A.; ANNE, V. K. 2002. Isolation and characterization of endophytic colonizing bacteria from agronomic crops and prairie plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 2198-2208.
- DULMAGE, H. T.; AIZAWA, K. 1982. Distribution of *Bacillus thuringiensis* in nature. (pp. 209-237). En: E. Kurstak (Ed.). *Microbial and Viral Pesticide*. Marcel Dekker. New York.
- FINNEY, D. J. 1971. *Probit analysis*. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom. 333 p.
- FUJIMOTO, H.; ITOH, K.; YAMAMOTO, K.; KYOZUKA, J.; SHIMAMOTO, K. 1993. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Biotechnology* 11: 1151-1155.
- GELERNTER, W. 1990. Targeting insecticide-resistance markers: new developments in microbial based product. Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies. *American Chemical Society-USA* 4221: 105-117.
- GELERNTER, W.; SCHWAB, G.E. 1993. Transgenic bacteria, viruses, algae and other microorganisms as *Bacillus thuringiensis* toxin delivery systems (pp. 89-104). En: P.F. Entwistle, J.S. Cory, J. Bailey and S. Higgs (Eds.). *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. John Wiley. New York.
- GÓMEZ DE AIZPURÚA, C.; ARROYO-VARELA, M. 1994. Principales noctuidos actuales de interés agrícola. Edigur. Madrid. 145 p.
- GYANESHWAR, P.; JAMES, E. K.; MATHAN, N.; REDDY, P. M.; REINHOLD-HUREK, B.; LADHA, J. K. 2001. Endophytic colonization of rice by a diazotrophic strain of *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology* 183: 2634-2645.
- HARDY, R.; BURNS, R.; HOLSTEN, T. 1973. Application of the acetylene reduction assay for the measurement of nitrogen fixation. *Soil Biology and Biochemistry* 5: 47-81.
- HATEM, A. E.; ABDEL-SAMAD, S. S. M.; SALEH, H. A.; SOLIMAN, M. H. A.; HUSSIEN, A. I. 2009. Toxicological and physiological activity of plant extracts against *Spodoptera littoralis* (Boisduval) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Boletín Sanidad Vegetal Plagas* 35: 517-531.
- HOFTE, H.; WHITELEY, H. R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews* 53: 242-255.
- HOSNY, M. M.; TOPPER, C. P.; MOAWAD, G. M.; EI-SAADANY, G. 1986. Economic damage thresholds of *Spodoptera littoralis* (Boisd.) (Lepidoptera: Noctuidae) on cotton in Egypt. *Crop Protection* 5: 100-104.
- IBRAHIM, N. A. A.; OMAR, M. N. A. 2009. Expression of the insecticidal protein gene *cry1C* of *Bacillus thuringiensis* in plant-colonizing nitrogen fixing bacteria. *Pest Technology* 3: 45-49.
- IBRAHIM, N. A. A.; SANNA, A. O.; MOHAMED, S. S.; MAGDY, A. M. 2008. Construction of a potent strain of *Bacillus thuringiensis* against the cotton leaf worm *Spodoptera littoralis*. *German Journal of Agriculture and Forestry Research* 58: 111-123.
- IBRAHIM, N. A. A.; HASSAN, O. S.; OMAR, M. N. A. 2006. Protection of cotton plant (*Gossypium barbadense*) against lepidopteran insects due to colonization with nitrogen fixing bacteria expressing the *Bacillus thuringiensis* toxin gene *Cry1C*. *Egypt Journal of Genetics and Cytology* 35: 305-319.
- JAMES, E. K.; G. PRASAD, M. NATARAJAN, B. L. WILFREDO, L. BARRAQUIO, R. M. PALLAVOLA, O. L. FABIO; L. K. JAGDISH. 2002. Infection and colonization of rice seedling by the plant growth-promoting bacterium *Herbaspirillum seropedicae* Z67. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 15: 894-906.
- JAMES, E. K.; OLIVARES, F. L. 1998. Infection and colonization of sugarcane and other graminaceous plants by endophytic diazotrophs. *Critical Reviews in Plant Sciences* 17: 77-119.
- KALMAN, S.; KIEHNE, K. L.; COOPER, N.; REYNOSO, M. S.; YAMAMOTO, T. 1995. Enhanced production of insecticidal proteins in *Bacillus thuringiensis* strains carrying an additional crystal protein gene in their chromosomes. *Applied and Environmental Microbiology* 61: 3063-3068.
- LAMBERT, B.; PERFEROEN, M. 1992. Insecticide promise of *Bacillus thuringiensis*. Facts and mysteries about a successful biopesticide. *Bioscience* 42: 112-122.
- LAMPEL, J.; CANTER, G.; DUMOCK, M.; KELLY, J.; ANDERSON, J.; URATANI, B. 1994. Integrative cloning, expression and stability of the *cry1A(c)* gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in a recombinant strain of *Clavibacter xyli* subsp. *cynodontis*. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 501-508.
- LEE, M. K.; CURTISS, A.; ALCANTARA, E.; DEAN, D. H. 1996. Synergistic effect of the *Bacillus thuringiensis* toxins *Cry1Aa* and *Cry1Ac* on the gypsy moth, *Lymantria dispar*. *Applied and Environmental Microbiology* 62: 583-586.
- NAVON, A.; WYSOKI, M.; KEREN, S. 1983. Potency and effect of *Bacillus thuringiensis* preparations against larvae of *Spodoptera littoralis* and *Boarmia (Ascotis) selenaria*. *Phytoparasitica* 11: 3-11.
- NESTER, E.; THOMASHOW, L. S.; METZ, M.; GORDON, M. 2002. 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical Scientific Assessment. *American Academy of Microbiology*, Washington, D. C. (www.asmsa.org/acasrc/aca1.htm).
- OBUKOWICZ, M.; PERLAK, F.; KUSANO-KREZTMER, K.; MAYER, E.; BOLTEN, S.; WATRUD, L. 1986. Tn5-mediated integration of the deltaendotoxin gene from *Bacillus thuringiensis* into the chromosome of root-colonizing pseudomonads. *Journal of Bacteriology* 168: 982-989.
- PAGE, A. L.; MILLAR, R. H.; KEENY, D. R. 1982. Methods of soil analysis. *American Agriculture Inc. Madison*. 1159 p.

- PERLAK, F. J.; FUCH, R. L.; DEAN, D. A.; MCPHERSON, S. L.; FISCHHOFF, D. A. 1991. Modification of the coding sequences enhances plant expression of insect control protein genes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States 88: 3324-3338.
- POITOUT, S.; BUES, R. 1974. Élevage de chenilles de vingt-huit espèces de lépidoptères Noctuidae et de deux espèces d'Arctiidae sur milieu artificiel simple. Particularités de l'élevage selon les espèces. Annales de Zoologie-Ecologie Animale 6: 431-441.
- PUSZTAI, M.; FAST, P.; GRINGORTEN, L.; KAPLAN, H.; LES-SARD, T.; CAREY, P. R. 1991. The mechanism of sunlight-mediated inactivation of *Bacillus thuringiensis* crystals. Biochemistry Journal 273: 43-47.
- RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L.; SAVIN, N. E. 1977. POLO: a new computer program for probit analysis. Bulletin of the Entomological Society of America 23: 209-213.
- SANCHIS, V.; CHAUFaux, J.; PAURON, D. 1994. A comparison and analysis of the toxicity and receptor binding properties of *Bacillus thuringiensis* CryIC delta-endotoxin on *Spodoptera littoralis* and *Bombyx mori*. FEBS Letters 353: 259-263.
- SCHNEPF, E.; CRICKMORE, N.; VAN RIE, J.; LERECLUS, D.; BAUM, J.; FEITELSON, J. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiology and Molecular Biology Reviews 62: 775-806.
- SOMASEGARAN, P.; HOBEN, H. 1985. Methods in legume-*Rhizobium* technology. University of Hawaii. Nifal Project and Mircen. Hawaii, 367 p.
- STOCK, C.; MCLOUGHLIN, T.; KLEIN, J.; ADANG, M. 1990. Expression of *Bacillus thuringiensis* crystal protein gene in *Pseudomonas cepacia* 526. Canadian Journal of Microbiology 39: 879-884.
- SUDHA, S. N.; JAYAKUMAR, R.; VAITHILINGAM, S. 1999. Introduction and expression of the cry1Ac gene of *Bacillus thuringiensis* in a cereal-associated bacterium, *Bacillus polymyxa*. Current Microbiology 38: 163-167.
- THEODULOZ, C.; VEGA, A.; SALAZAR, M.; GONZÁLEZ, E.; MEZA-BASSO, L. 2003. Expression of a *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin cry1Ab gene in *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* strains that naturally colonize the phylloplane of tomato plants (*Lycopersicon esculentum*, Mills). Journal of Applied Microbiology 94: 375-381.
- TIEDJE, J.; COLWELL, R.; GROSSMAN, Y.; HODSON, R.; LENSKI, R.; MACK, R. 1989. The planned introduction of genetically engineered organisms: ecological considerations and recommendations. Ecology 70: 298-315.
- WAALWIJK, C.; DULLEMANS, A.; MAAT, C. 1991. Construction of a bioinsecticidal rhizosphere isolate of *Pseudomonas fluorescens*. FEMS Microbiology Letters 77: 257-64.

Recibido: 18-mar-2011 • Aceptado: 31-oct-2011