

PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE CEPAS DE *BACILLUS THURINGIENSIS* NATIVAS DEL ESTADO DE MORELOS SOBRE *DIATRAEA MAGNIFACTELLA* (LEPIDOPTERA: CRAMBIDAE)

ALICIA FONSECA G.,¹ GUADALUPE PEÑA CH.,^{2,*} ADRIANA G. TREJO L.,²
LAURA P. LINA G.,¹ LUIS Á. RODRÍGUEZ B.³ Y VÍCTOR M. HERNÁNDEZ V.¹

¹Laboratorio de Control Biológico, Centro de Investigación en Biotecnología. Laboratorio de
Parasitología Vegetal,

²Centro de Investigaciones Biológicas. Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Av.
Universidad No. 1001, Col. Chamilpa, Cuernavaca C.P. 62209, Morelos.

³INIFAP Rio Bravo. Carretera Matamoros Reynosa Km. 61, Col. Zona Rural, Rio Bravo. C.P.88900,
Río Bravo, Tamaulipas *Autor para correspondencia: <penacg@uaem.mx>

**Fonseca G., A., Peña Ch., G., Trejo L., A. G., Lina G., L. P., Rodríguez B., L. Á. & Hernández
V., V. M.** 2013. Patogenicidad y virulencia de cepas de *Bacillus thuringiensis* nativas del estado de
Morelos sobre *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.),
29(3): 534-543.

RESUMEN. La caña de azúcar representa uno de los cultivos industriales más importantes en México, diversos insectos se alimentan de ésta, provocando pérdidas económicas considerables. Para el estado de Morelos se reporta la presencia de los barrenadores *Diatraea magnifactella* y *Eoreuma loftini*. Para su control se han usado insecticidas químicos, a la fecha no existen bioinsecticidas a base de bacterias entomopatógenas. Existen reportes de evaluaciones in vitro y en campo contra otras especies de barrenadores, por lo que en el presente trabajo se aislaron cepas de *Bacillus thuringiensis* (Bt) a partir de cadáveres de *D. magnifactella*. Se evaluó la patogenicidad y virulencia de las cepas bacterianas sobre larvas neonatas del barrenador para lo cual se estableció un pie de cría de *D. magnifactella* en laboratorio, garantizando así la sanidad de las larvas usadas en los bioensayos. Se obtuvo un total de 118 cepas de *B. thuringiensis*. Los cuales se agruparon en tres categorías, dependiendo del peso molecular de las proteínas mayoritarias (perfil proteico) producidas por la bacteria. De los bioensayos de patogenicidad realizados, seis de las 118 cepas evaluadas fueron las que ocasionaron una mortalidad mayor al 50% en las larvas neonatas de *D. magnifactella*. Se determinó la Concentración Letal 50 de éstas seis cepas, la que presentó mejores resultados fue la cepa B148 con CL₅₀ de 254.01 ng/cm² de dieta, menor a la de la cepa comercial HD1 417.61 ng/cm², evaluada como testigo positivo. Las cinco cepas restantes presentaron CL₅₀ superiores a la de la cepa testigo.

Palabras clave: Barrenador, entomopatógeno, cepa.

Recibido: 06/08/2012; aceptado: 06/05/2013.

Fonseca G., A., Peña Ch., G., Trejo L., A. G., Lina G., L. P., Rodríguez B., L. Á. & Hernández V., V. M. 2013. Virulence of *Bacillus thuringiensis* strains native to the state of Morelos on *Diatraea magnifactella* (Lepidoptera: Crambidae). *Acta Zoológica Mexicana* (n.s.), 29(3): 534-543.

ABSTRACT. Sugarcane is one of the most important industrial crops in Mexico, several insects feed on it, causing important economic losses. At the state of Morelos two species are found; *Diatraea magnifactella* and *Eoreuma loftini*. To control these borers chemical insecticides are used, today there are not any bioinsecticide based on entomopathogenic bacteria. It has already been reported in the literature against other borer species the use of entomopathogenic bacteria, so in this work was proposed to isolate *Bacillus thuringiensis* (Bt) from cadavers of *D. magnifactella* to evaluate the pathogenicity and virulence of bacterial isolates on neonate larva. It was possible the establishment a colony of *D. magnifactella* at laboratory, ensuring the health of the larvae used in bioassays. We obtained a total of 118 bacterial isolates, presumably from *B. thuringiensis*. Which were grouped into three groups, depending on their protein profile. Six of the 118 strains caused more than 50% of mortality in neonate larvae of *D. magnifactella*. The LC₅₀ of isolates been defined, the best was the B148 by 254.01 ng/cm² of food. The LC₅₀ the commercial strain HD1 was 417.61 ng/cm², used as appositive control. The five remaining isolates showed LC₅₀ greater than that of the positive control.

Key words: Borer, entomopatogenic, strain.

INTRODUCCIÓN

La caña de azúcar representa uno de los cultivos industriales más importantes en nuestro país, con cerca de 700 mil hectáreas cultivadas y con 58 ingenios azucareros, distribuidos en las regiones del Pacífico, Centro Sur y las Huastecas. En el estado de Morelos, en 21 municipios se cultiva caña de azúcar, colocándose como el de mayor rendimiento a nivel nacional, en la combinación riego-temporal (SIAP 2009). De éste cultivo se obtienen varios subproductos como el azúcar, alcohol, melaza y otros. Sin embargo la producción se ve mermada por el ataque de diversos insectos barrenadores que provocan pérdidas económicas considerables. Los daños que causan dichos barrenadores es la muerte del tejido central de los tallos, lo que provoca tallos rotos, pérdida de peso en la producción de azúcar y daño en las cañas que se usan para semilla (Rosas et al. 2003). Se estima que los daños por los barrenadores ocasionan pérdidas por más de 100 millones de pesos al año en varios estados de la República Mexicana (Vejar 2004). Las principales especies de barrenadores pertenecen al Orden Lepidoptera, particularmente a la familia Crambidae, que incluye los géneros *Eoreuma* y *Diatraea*. Los reportes para Morelos indican la presencia de *D. magnifactella* y *E. loftini*, siendo la primera la que más presencia tiene en las zonas cañeras del Estado (Rodríguez del Bosque & Vejar 2008). Los daños directos que causa el barrenador son: muerte del punto de crecimiento del tallo (meristemo primario), perforación del tallo formando galerías longitudinales, las cuales pueden atravesar varios nudos. De manera indirecta ocasionan el acame y muerte de las plantas, reducción del tamaño del tallo, así mismo facilita la entrada de otros organismos a la galería, como la del hongo *Physalospora tucumanensis*, causal de la pudrición roja, que tienen como consecuencia la reducción del contenido de azúcar.

Para el control de éstas especies se han usado tradicionalmente insecticidas de origen químico de amplio espectro, como organofosforados y carbamatos como monocrotofos y carbofuran sin embargo los hábitos del barrenador complican la eficacia de los mismos (Capineira 2001). Dentro de los agentes de control biológico usados, existen reportes del uso de parasitoides, como *Cotesia flavipes* para control de *D. saccharalis*, taquínidos y otros. Sin embargo pueden presentar problemas como la incompatibilidad fisiológica, como la encapsulación de los huevos de los parasitoides (Alleyne y Wiedenmann 2001).

Existe poca información del uso de entomopatógenos para el control de *Diatraea* spp. y la existente se enfoca principalmente a la especie *D. saccharalis*, un barrenador de importancia económica que es capaz de causar gran daño en caña y maíz (Rodríguez Del Bosque & Vejar 2008).

Rosas *et al.* (2003), reportan el uso de *Bacillus thuringiensis* (Bt) con éxito para el control de *D. saccharalis*, por otro lado los trabajos realizados por Medeiros *et al.* (2007), muestran lo prometedor del uso de toxinas Cry, al realizar bioensayos con cinco cepas de Bt para el control de *D. saccharalis*.

Dado lo anterior expuesto, en el presente trabajo se aislaron cepas de *B. thuringiensis* a partir de cadáveres de *D. magnifactella*, se evaluó la patogenicidad y virulencia de las cepas bacterianas sobre éste lepidóptero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para iniciar la cría en laboratorio de *D. magnifactella*, en las zonas cañeras del estado de Morelos se revisaron cultivos, enfatizando en aquellas cañas que presentaron muerte en la parte central de la planta, éstas se examinaron en los nudos que se encontraban en las partes más bajas. Las que se encontraron en campo se trajeron al laboratorio y fueron sometidas a un tren de desinfección con benzoato de sodio al 0.5% y tres baños subsecuentes de agua destilada estéril, para después ser alimentadas con una dieta merídica (modificado de Mihm 1984), se mantuvieron en condiciones de temperatura ambiente y un foto periodo de 14h luz y 10h oscuridad.

Aquellos organismos de campo que se encontraron muertos y con una apariencia constreñida y negruzca; se procesaron para aislar posibles bacterias entomopatógenas, específicamente *B. thuringiensis*. Se llevó registros del número y localización de las larvas muertas que se colectaron en campo, con la finalidad de tener datos que nos muestren la incidencia natural de Bt sobre *D. magnifactella* en las zonas cañeras del Estado de Morelos.

Para la obtención de las bacterias entomopatógenas, los organismos muertos se maceraron en tubos eppendorf de 1.5 ml estériles, a los que se les agregó 1 ml de medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB). El criterio para determinar la presencia de Bt fue la apariencia en la placa, corroborando por observaciones al microscopio, en donde fue posible la observación del cristal parasporal.

Una vez que se obtuvieron colonias únicas, se determinó el perfil proteico de las mismas, corriendo las muestras en geles desnaturalizantes de poliacrilamida con duodecilo sulfato de sodio (SDS-PAGE), a una concentración del 10% y el marcador de peso molecular All Blue (BioRad).

Se realizaron evaluaciones de patogenicidad de todas las cepas aisladas de Bt. Se probaron dos concentraciones de proteína total, 1000 y 25 000 ng/cm² con una sola repetición. La concentración de proteína evaluada fue colocada de manera superficial en dieta merídica, en cajas tipo Cell-Wells, en un volumen de 35 µL por pozo, la proteína fue esparcida homogéneamente hasta cubrir la superficie de la dieta. Las placas se dejaron secar a temperatura ambiente y se procedió a colocar una larva neonata de barrenador por pozo. Se permitió que las larvas se alimentaran de la dieta durante siete días y al término se procedió a determinar el porcentaje de mortalidad en ambas concentraciones. La unidad experimental de los bioensayos consistió en una caja tipo Cell-wells de 24 pozos con 20 larvas de *D. magnifactella*. Para aquellas cepas que provocaron una mortalidad mayor del 50% de la muestra probada, se les determinó la CL₅₀.

Para determinar la CL₅₀ se evaluaron al menos cinco concentraciones con tres repeticiones. Las concentraciones evaluadas difirieron en cada cepa (B9 250, 500, 750, 1,000 y 1,250; B32 50, 100, 500, 1,000 y 1,500; B40 100, 500, 1,000, 1,500 y 2,000; B148 y HD1 100, 200, 250, 500 y 750; B150 y 165 1,000, 5,000, 10,000, 20,000 y 30,000). Los bioensayos realizados fueron por la técnica de contaminación superficial de dieta, similares a los realizados para determinar patogenicidad. Para la obtención de las Concentraciones Letales se utilizó el paquete estadístico Polo plus, bajo un análisis Probit. El diseño experimental usado fue un Diseño Completamente al Azar (DCA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se obtuvieron 118 cepas de Bt, indicado por la presencia del cristal parasporal y características físicas del crecimiento bacteriano en cajas. Dichas cepas se aislaron directamente de cadáveres de *D. magnifactella*, de un total de 701 muestras procesadas. Esto representa el 16.83% de las muestras totales. En el Cuadro 1 se muestran los resultados obtenidos del tamiz realizado a las cepas de Bt, así como los perfiles proteicos que éstas mostraron.

En cuanto a los perfiles proteicos observados, los resultados sugieren que podría ser el consorcio de proteínas, el responsable de la muerte de los insectos, o bien ser sólo una de ellas la causante de la toxicidad. Hofte & Whiteley (1989), reportan proteínas de 60 a 65 kDa que se relacionan con la tipo Cry2, así mismo una con peso superior a los 140 kDa, presumiblemente tipo Cry1. Estos pesos (específicamente 60 y 150 kDa), son presentados por las cepas B9 y B32, con 60 kDa y B165 con 150 kDa, estas cepas ocasionaron mortalidades del 50 al 75%.

Cuadro 1. Perfiles proteicos de las cepas de Bt obtenidas, y mortalidades que ocasionó a *D. magna factella*.

AISLADO	PORCENTAJE DE MORTALIDAD		PERFIL PROTEICO
	1,000 ng/cm ²	25,000 ng/cm ²	
B-5	25.00	8.33	40, 25
B-8	4.17	4.17	40, 25
B-9	50.00	37.50	60, 45, 25
B-10	16.67	20.83	100, 75, 40, 15
B-11	16.67	20.83	40, 20
B-12	0.00	4.17	20
B-13	33.33	4.17	25 y 37
B-14	8.33	4.17	25
B-15	12.50	12.50	25
B-16	4.17	12.50	20
B-17	20.83	29.17	20
B-21	12.50	25.00	20 y 15
B-22	20.83	12.50	20 y 15
B-23	33.33	25.00	30
B-26	16.67	12.50	20
B-27	25.00	12.50	15
B-29	20.83	16.67	20
B-30	29.17	25.00	25 y 37
B-31	12.50	20.83	20
B-32	58.33	25.00	100, 60, 45 y 30
B-33	12.50	20.83	30
B-36	20.83	25.00	30
B-37	29.17	25.00	100, 30 y 15
B-40	66.67	16.67	100 y 30
B-41	25.00	20.83	100, 30 y 15
B-43	8.33	25.00	150 y 20
B-44	0.00	20.83	20 y 15
B-45	0.00	25.00	150 y 15
B-48	20.83	12.50	30 y 10
B-49	25.00	12.50	150 y 15
B-50	12.50	0.00	15
B-56	0.00	16.67	30 y 15

AISLADO	PORCENTAJE DE MORTALIDAD		PERFIL PROTEICO
	1,000 ng/cm ²	25,000 ng/cm ²	
B-57	0.00	4.17	150 y 15
B-58	16.67	16.67	150 y 25
B-59	20.83	12.50	30
B-60	29.17	12.50	40
B-61	0.00	0.00	25
B-62	0.00	0.00	25
B-63	33.33	12.50	25
B-64	12.50	20.83	25
B-65	8.33	20.83	100 y 50
B-66	8.33	12.50	100 y 75
B-68	20.83	20.83	100 y 75
B-69	8.33	8.33	100 y 75
B-70	33.33	37.50	15
B-72	16.67	12.50	100 y 75
B-73	0.00	0.00	15
B-74	20.83	25.00	25
B-75	0.00	0.00	25
B-76	4.17	12.50	100
B-77	4.17	4.17	100
B-79	0.00	0.00	100
B-82	25.00	25.00	100
B-83	0.00	0.00	75
B-84	8.33	29.17	100
B-85	29.17	12.50	75
B-88	16.67	20.83	75
B-90	12.50	12.50	100
B-95	12.50	0.00	75
B-96	8.33	0.00	150
B-101	20.83	12.50	25
B-103	0.00	0.00	40
B-104	0.00	0.00	40
B-107	29.17	37.50	40
B-114	0.00	0.00	25
B-116	0.00	0.00	100 y 30

AISLADO	PORCENTAJE DE MORTALIDAD		PERFIL PROTEICO
	1,000 ng/cm ²	25,000 ng/cm ²	
B-117	0.00	0.00	100 y 30
B-118	16.67	20.83	100
B-119	4.17	0.00	100
B-120	12.50	0.00	150
B-121	4.17	4.17	25
B-124	4.17	8.33	40
B-132	20.83	20.83	25
B-133	8.33	20.83	100 y 25
B-134	4.17	0.00	100 y 10
B-135	4.17	0.00	10
B-136	16.67	4.17	10
B-137	8.33	4.17	10
B-138	4.17	4.17	100 y 30
B-139	0.00	4.17	130 y 15
B-140	8.33	0.00	10
B-141	4.17	0.00	10
B-142	0.00	0.00	10
B-143	4.17	20.83	25
B-144	0.00	0.00	25
B-145	0.00	4.17	100 y 30
B-146	16.67	8.33	100 y 30
B-148	75.00	79.17	150 y 20
B-149	33.33	29.17	25
B-150	20.83	75.00	100, 45 y 25
B-151	33.33	41.67	40
B-152	12.50	4.17	150 y 25
B-153	25.00	20.83	25
B-154	4.17	20.83	100
B-155	20.83	29.17	100
B-156	33.33	29.17	25
B-157	4.17	4.17	25
B-158	8.33	0.00	100 y 30
B-159	12.5	4.17	100 y 30
B-160	0.00	4.17	100

AISLADO	PORCENTAJE DE MORTALIDAD		PERFIL PROTEICO
	1,000 ng/cm ²	25,000 ng/cm ²	
B-161	0.00	8.33	100
B-162	0.00	0.00	100
B-169	12.5	0.00	100
B-163	4.17	4.17	150 y 25
B-164	4.17	0.00	150 y 25
B-165	20.83	75.00	150, 30 y 25
B-166	12.5	16.67	150 y 25
B-167	8.33	12.5	150 y 25
B-168	8	8.33	150 y 25
B-170	12.5	20.83	100 y 25
B-171	0.00	8.33	100 y 25
B-172	12.5	4.17	100 y 25
B-173	0.00	0.00	150
B-174	0.00	0.00	150 y 25
B-175	0.00	0.00	40
B-176	8.33	25.00	100 y 25
B-177	20.83	0.00	100 y 25

Los trabajos realizados con barrenadores de caña se han centrado en *D. saccharalis*, usando toxina pura y cepas HD incorporadas en las dietas del barrenador, a concentraciones de 10 a 100 µg ml⁻¹ sobre larvas neonatas, obteniendo una CL₅₀ de 33.21 µg ml⁻¹ (Rosas et al. 2003), dichas concentraciones son altas a las usadas en los experimentos aquí efectuados, en los cuales se lograron obtener porcentajes de mortalidad superiores al 50% usando una concentración de 1,000 ng/cm². Así mismo los trabajos realizados por Ramos et al. (2004), en los que usaron cepas aisladas de muestras de suelo, causaron mortalidades del 70% a concentraciones de 500µg/cm³ sobre *D. saccharalis*, lo que demuestra que fue necesario usar dosis altas para obtener ese porcentaje de mortandad, debido probablemente a que no había especificidad de las cepas.

De las 118 cepas evaluadas seis, es decir el 5%, ocasionaron una mortalidad mayor al 50%, este resultado es semejante al reportado por Bohorova et al. (1996), quienes probaron 352 cepas de Bt sobre *D. grandiosella* y *D. saccharalis*, obteniendo que cuatro ocasionaron una mortalidad superior al 50% para la primera especie y ninguna cepa fue capaz de matar al 50% de los organismos en *D. saccharalis*. Los porcentajes de mortalidad alcanzados por el grupo dos fueron mayores que el del uno, las cepas B40 y B148, ocasionaron mortalidades superiores al 60%, este

porcentaje no se obtuvo en ninguna de las cepas del grupo uno, donde sólo una de ellas provocó mortalidades del 40%. Reportes hechos por Hofte & Whiteley (1989), mencionan que existen proteínas de Bt con un peso superior a los 140 kDa, que se asumen como una protoxina tipo Cry1, a las cuales se asocia la toxicidad provocada a lepidópteros, éstas protoxias se semejan en peso a las producidas por la cepa B148, la cual fue la que provocó la mayor mortalidad a *D. magnifactella* en concentraciones bajas.

En el Cuadro 2 se muestran las CL₅₀ obtenidas tanto en las cepas nativas como en la comercial HD-1. La cepa B148 presentó una CL₅₀ menor que la comercial HD1. Resultados similares se obtuvieron por Rosas *et al.* (2003), quienes probaron nueve cepas de colección HD y tres nativas de la colección del Departamento de Microbiología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, sobre *D. saccharalis* y observaron que la cepa GM34 var *kursataki*, fue la que presentó una CL₅₀ menor, incluso que las HD133 y HD551. Los resultados indican que la cepa comercial HD1, no es considerada como tóxica para *D. saccharalis*, resultado que se contrapone a los obtenidos por Ramos *et al.* (2004), los cuales obtuvieron una mortalidad de 90% sobre *D. saccharalis* ocasionada por esta cepa. A pesar de que el trabajo fue realizado sobre *D. magnifactella*, nuestros resultados en cuanto a la efectividad de la cepa comercial HD1, se asemejan a los obtenidos por Ramos *et al.* (2004). Sobre la efectividad de las cepas nativas y la comercial, los resultados por Rosas *et al.* (2003), concuerdan con los obtenidos en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

Los aislados obtenidos, representaron el 16.83% de las muestras procesadas, porcentaje alto al relacionarlo con la ecología de Bt. Ya que se sabe que la bacteria permanece de manera enzootica en las poblaciones insectiles. Aumentando su presencia cuando se presentan eventos ambientales, como el aumento de la temperatura o susceptibilidad de las poblaciones.

Cuadro 2. Concentraciones Letales Medias obtenidas de las distintas cepas de Bt.

Cepa	CL ₅₀ ng/cm ²	Límites de confianza al 95%	Sitio de colecta
B-9	952.95	765.33 – 1 338.74	Yautepec
B-32	780.43	528.65 – 1 098.00	Yautepec
B-40	1 209.52	865.26 – 1 573.77	Yautepec
B-148	254.01	185.30 – 351.98	Yautepec
B-150	9 971.90	5 672.20 – 13 363.00	Ayala
B-165	6 475.70	2 501.90 – 9 668.30	Puente de Ixtla
HD-1	417.61	268.24 – 626.91	

De los 118 aislados evaluados sobre *D. magnifactella*, sólo seis fueron virulentos, lo que representa el 5.08%. Este dato podría apreciarse como bajo, sin embargo se sabe que Bt es una bacteria patógena más no altamente virulenta, este hecho esta relacionado con la teoría evolutiva que sugiere que existe una relación adaptativa de a mayor densidad poblacional mayor virulencia (Ben et al. 2008).

La cepa B148 presentó la CL₅₀ menor que de las cinco cepas restantes evaluadas, incluso que el testigo positivo, la cepa comercial HD-1. Esto nos habla de la efectividad superior de las cepas nativas contra las comerciales, dado a las adaptaciones que pueden presentar en cuanto a condiciones bióticas y abióticas presentes en el ambiente.

LITERATURA CITADA

- Alleyne, M. y R. N. Wiedenmann.** 2001. Encapsulation and hemocyte numbers in three lepidopteran stemborers parasitized by *Cotesia flavipes*-complex endoparasitoids *Entomologia Experimentalis et Applicata* 100 (3): 279-293.
- Ben, R., R. J. Elis & B. Bonsái.** 2008. Moderation of pathogen-induced mortality: the role of density in *Bacillus thuringiensis* virulence. *Biology Letters*, 5: 218-220.
- Bohorova, N., A. M. Maciel, R. M. Brito, I. Aguilar, J. E. Ibarra & D. Hoisington.** 1996. Selection and characterization of mexican strains of *Bacillus thuringiensis* active against four major lepidopteran maize pests. *Entomophaga*, 41(2): 153-165.
- Capinera, J. L.** 2001. Sugar cane borer, *Diatraea saccharalis* (Fabricius) (Insecta: Lepidoptera: Pyralidae). Department of Entomology y Nematology, Florida. Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. EENY-217. Pp 1-5. CABI Bioscience, CBS, Landcare research. 2007. Index Fungorum. Available: <http://www.indexfungorum.org>.
- Rodríguez Del Bosque, L & G. C. Vejar.** 2008. Barrenadores del Tallo (Lepidoptera: Crambidae) del Maíz y Caña de Azúcar. En Casos de Control biológico en México. Editorial Mundi-Prensa. Pp 9-22.
- Griffitts, J & V. Aroian Raffi.** 2005. Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, 27: 614–624.
- Hofte, H. & H. R. Whiteley.** 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology Reviews*, 53: 242-255.
- Medeiros P. G., M. Teixeira, R. M. Gomes, E. Beni & Ivo B.** 2007. A Brazilian *Bacillus thuringiensis* strain highly active to sugar cane borer *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Crambiidae). *Brazilian Journal of Microbiology*, 38: 531-537.
- Mihm, J.** 1984. Técnicas eficientes para la crianza masiva de infestación de insectos, en la selección de plantas hospedantes para la resistencia al gusano de la mazorca o elotero *Heliothis zea*. Centro Internacional para el Mejoramiento del maíz y trigo. Folleto técnico. 17pp.
- Peña, G., J. R. Miranda, G. de la Riva, L. L. Pardo, M. Soberón, & A. Bravo.** 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein envolved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1): 353-360.
- Ramos, F, A. Carmona & Beres M.** 2004. Evaluación de aislamientos de *Bacillus thuringiensis* tóxicos a *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). *Bioagro*, 16:183-188.
- Rodríguez Del Bosque, L A. & G. C. Vejar.** 2008. Barrenadores del Tallo (Lepidoptera: Crambidae) del Maíz y Caña de Azúcar, pp: 9-22. En: *Casos de Control biológico en México*. Editorial Mundi-Prensa.

- Rosas, G. N., K. Arévalo, B. Pereyra, H. Medrano, L. Galán, J. F. Pérez & L. Morales.** 2003. Elaboración de un bioinsecticida contra el gusano barrenador de la caña de azúcar. *Ciencia UANL*, Vol. VI: 491:496.
- Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler & D. H. Dean.** 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62 (3): 775-806.
- Sistema de Información Agrícola y Pecuario.** 2009. www.Siap.gob.mx
- Vejar, C., G.** 2004. Control biológico del gusano barrenador del tallo (Lepidoptera: Crambidae) de la caña de azúcar en Sinaloa. Pp: 70-84. En: Rodríguez, B., L.A., G. Vejar & E. Cortez (Ed) Taller Internacional sobre Barrenadores del Tallo de Caña de Azúcar. Sinaloa México.