

Selección de cepas de *Bacillus thuringiensis* con efecto nematicida

María Elena Márquez Gutiérrez¹
Emilio Fernández González¹

RESUMEN. La selección y evaluación de cepas de *Bacillus thuringiensis* con nuevas potencialidades de control podría aumentar sus posibilidades de uso. Son pocas las cepas de *B. thuringiensis* con actividad conocida contra nematodos, incluyendo especies parásitas de plantas. Se probaron 37 cepas de *B. thuringiensis* contra *Meloidogyne incognita* in vitro. Los criterios de selección fueron la reducción por encima del 80% de la eclosión de las masas de huevos en comparación al testigo, y la irreversibilidad de este efecto. Las cepas LBT1, LBT3, LBT4, LBT24, LBT25 y LBT47 provocaron deformación y detención del proceso embrionario de los huevos algunos de ellos necrotizados. También varios juveniles (J2) dentro de las masas de huevos, no reaccionaron bajo estímulos luminosos, y mostraron vacuolizaciones y deformaciones en el sistema digestivo. La fracción tóxica más efectiva fue el sobrenadante, que contiene las exotoxinas termoestables. Aunque la naturaleza química de los sobrenadantes no fue determinada, los resultados sugieren que las exotoxinas termoestables tienen un papel importante en la actividad nematicida.

Palabras claves: control de nematodos, actividad nematicida, plaguicidas bacterianos, exotoxinas.

ABSTRACT. Selection of nematicide *Bacillus thuringiensis* strains. The selection and evaluation of *Bacillus thuringiensis* strains with new control possibilities is an international practice that may increase their use. There are few *B. thuringiensis* strains with known activity against nematodes, including plant parasitic species. Thirty-seven strains of *B. thuringiensis* were tested against *Meloidogyne incognita* in vitro bioassays. The selection criteria were the reduction of egg mass hatchings (more than 80% compared with the control) and the irreversibility of this effect. Strains LBT1, LBT3, LBT4, LBT24, LBT25 and LBT47 interrupted the development of egg masses, some of which appeared necrotic. Some juveniles (J2) inside of the egg masses had no reaction under luminic stimuli and others showed vacuolization and malformations in the digestive system. The most effective toxin fraction was the supernatant, containing the thermostable exotoxins. Although the chemical nature of the supernatants was not determined the results suggested the presence of extracellular toxins with an important role in the nematicidal activity.

Keywords: nematode control, bacterial pesticides, exotoxins, nematicidal activity.

Introducción

Bacillus thuringiensis Berliner es la bacteria entomopatógena más conocida, estudiada y utilizada como agente de control microbiano. Más del 90% del mercado de bioinsecticidas incluye productos a base de esta bacteria (Glare y O'Callaghan 2000). En el mundo existen alrededor de 60.000 aislados de *B. thuringiensis*, pertenecientes a colecciones públicas y privadas, lo que revela el interés que existe en la aplicación de esta bacteria como agente de biocontrol (Boucias y Pendland 1998).

La actividad nematicida de cepas nativas de *B. thuringiensis* fue observada por Meadows et ál. (1990) en huevos de nematodos de vida libre, con un efecto diferencial entre las distintas cepas.

A partir de 1992 aparecieron patentes de aplicación de Mycogen Corporation (San Diego, EUA), que refieren el uso de cepas de *B. thuringiensis* como agente biocontrolador de nematodos fitoparásitos (Zuckerman et ál. 1995). Otras patentes cubren la clonación de genes de *B. thuringiensis* y su transferencia al genoma de microorganismos y plantas

¹ Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110, No 514,e/5ta B y 5ta F, C.P. 11300, Playa, Cuba. mmarquez@inisav.cu

para que se expresen allí y controlen los nematodos susceptibles (August et ál. 1994).

Flores et ál. (2000) recomendaron el uso de esta especie para el tratamiento de plantas e incluso animales susceptibles a nematodos. Zuckerman et ál. (1993) aplicaron la bacteria directamente sobre semillas, plantas y suelos, obteniendo resultados promisorios contra *Meloidogyne javanica* Treub y *Tylenchulus semipenetrans* Coob; las cepas no causaron fitotoxicidad ni patogenicidad a las plantas tratadas (tomate y plátano) en condiciones semicontroladas y en experimentos de campo.

Las formulaciones comerciales que contienen solamente la δ -endotoxina han resultado eficaces para el control de *M. javanica* y *T. semipenetrans* (Leyns et ál. 1995), y Noel (1990) informó sobre los efectos nematostáticos y nematicidas de la β -exotoxina sobre *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) y *Heterodera glycines* Ichinohe.

La variabilidad tóxica de los cristales parasporales de *B. thuringiensis* es la que conduce a la bioactividad sobre varios grupos taxonómicos de insectos plagas, que es la más conocida a nivel mundial. A diferencia de las cepas con propiedades insecticidas, no se ha determinado aún la relación entre caracteres genéticos, patrón de proteínas Cry y morfología de los cristales tóxicos en cepas nematicidas, ni se han establecido procedimientos de selección. Por otra parte, la mayoría de los estudios que demuestran la actividad nematicida de esta bacteria han sido realizados en nematodos de vida libre o zoonematodos, por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar cepas cubanas de *B. thuringiensis* contra *Meloidogyne incognita*, teniendo en cuenta como criterios de selección la reducción de la eclosión de las masas de huevos, la irreversibilidad de este efecto y la acción biológica de diferentes fracciones independientemente de la morfología de los cristales y la variedad de las cepas, en condiciones in vitro.

Materiales y métodos

Se estudiaron 37 cepas de *B. thuringiensis* pertenecientes a la Colección de Bacterias Entomopatógenas del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal de Cuba (INISAV), conservadas en agar semisólido, bulbos liofilizados y glicerol (4 °C). Las cepas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) (Sambrook et ál. 1989) hasta esporulación total. Se sembró una asada de cada cultivo en placas de Petri con agar nutritivo (AN) (Oxoid CM3). La selección de las colonias se realizó estudiando las características morfológicas al microscopio de disección (40×). Para determinar la presencia de esporas y cristales

típicos de la especie se realizaron tinciones simples con violeta cristal (0,5%).

Las colonias fueron transferidas a tubos de ensayo con AN enriquecido con extracto de levadura, para incrementar el tamaño de los cristales parasporales, durante 96 horas hasta obtener cultivos totalmente esporulados, a 28 ± 2 °C. Después, se preparó una suspensión de cada cepa arrastrando el crecimiento activo de la bacteria en los tubos de ensayo con solución salina al 0,85%. La eliminación de las células vegetativas y la homogenización del cultivo se lograron manteniendo las cepas a una temperatura de 60 °C durante 15 minutos. Posteriormente se inocularon en erlenmeyers de 500 mL con caldo nutritivo, dejándolos en agitación a 140 r min^{-1} y a 30 ± 2 °C hasta la formación de cristales. La concentración de los cultivos se determinó a través de conteos en cámara de Neubauer. Las muestras para los bioensayos fueron ajustadas hasta obtener caldos a una concentración de 10^7 esporas mL^{-1} .

Evaluación del bioensayo

La actividad biológica de *B. thuringiensis* se evaluó mediante los procedimientos citados por Siddiqui (2002) para evaluar la supresión de nematodos formadores de agallas utilizando otras especies de bacterias. Se utilizaron poblaciones de *M. incognita* extraídas de plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) procedentes de cultivos organopónicos de Ciudad de la Habana. La especie de *Meloidogyne* fue identificada por el Dr. Emilio Fernández, del Laboratorio de Nematología del INISAV, de acuerdo con los criterios de Eisenback (1985).

No se consideraron raíces viejas ni necrosadas para la selección de las masas de huevos. La extracción fue manual. Las pequeñas masas de huevos fueron esterilizadas superficialmente durante 15 segundos con una solución de hipoclorito de sodio, preparada al 0,05% v/v, de modo que no se dañara la matriz gelatinosa. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada esterilizada y se colocaron en vidrios reloj dentro de placas de Petri de 15 cm de diámetro.

En cada vidrio reloj se añadieron 2 mL de los cultivos de las diferentes cepas por evaluar, depositando una ooteca por vidrio reloj. Se incluyó una placa con agua destilada como testigo y cada cepa tuvo cuatro réplicas; los ensayos se repitieron en tres ocasiones. Las condiciones de humedad fueron mantenidas introduciendo algodones humedecidos con agua en cada placa y los experimentos se realizaron a 26 ± 2 °C.

La evaluación se hizo a los 15 días contando la cantidad de juveniles emergidos del segundo estadio (J2), y se determinó el porcentaje de reducción con respecto al testigo sin tratar.

Determinación de la estabilidad del efecto de *B. thuringiensis* sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*

Se consideraron aquellos tratamientos del experimento anterior donde los porcentajes de reducción de la eclosión estuvieron por encima del 80%. Las evaluaciones se realizaron a los 7 y 15 días.

Las ootecas se transfirieron a vidrios reloj que contenían solamente agua destilada, aplastándolas suavemente con los cubreobjetos, y se observaron al microscopio óptico (200×). Se determinaron características anormales en el desarrollo embrionario de los huevos, así como el comportamiento de las larvas del nematodo (movimiento y respuesta ante la intensidad luminosa) después de este período.

Determinación de las fracciones tóxicas con actividad biológica

Los cultivos se centrifugaron a 5000 r min⁻¹ durante 15 min. Los precipitados se lavaron dos veces con una solución salina (pH = 7,2) con el fin de eliminar restos del medio de cultivo y concentrar las esporas y cristales.

La biomasa fue resuspendida en solución salina para el ajuste de la concentración (10⁷ esporas mL⁻¹) por conteo en cámara de Neubauer. El sobrenadante se filtró con filtro milipore de 0,2 μ, y fue tratado en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, verificándose la ausencia de esporas por siembra de las muestras en AN.

En el bioensayo se evaluaron como variantes los cultivos completos de cada cepa, la fracción de los sobrenadantes y las fracciones que contenían los precipitados formados por esporas y cristales.

Análisis estadístico

Se empleó el modelo de análisis de varianza y la prueba de Neuman-Keuls con transformación de los datos de porcentaje con un 0,95% de niveles de significación (Statitcf 1988).

Resultados y discusión

Actividad biológica de las cepas en condiciones in vitro
Las cepas LBT-1, LBT-3, LBT-4, LBT-12, LBT-24, LBT-26, LBT-32, LBT-35, LBT-47 y LBT-49 de *B. thuringiensis* manifestaron efectos inhibitorios totales sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*, con porcentajes de reducción del 100%. Las cepas LBT-2, LBT-5, LBT-14, LBT-20, LBT-23 y LBT-25 presentaron valores por encima al 80% (Cuadro 1), valor a partir del cual se consideró presencia de actividad nematocida en las cepas evaluadas. El resto de las cepas mostró niveles de inhibición inferiores al 80%, por lo que fueron descartadas.

Cuadro 1. Efecto de cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre huevos de *Meloidogyne incognita* en condiciones in vitro

Cepas	Reducción de la eclosión (%) ^z
LBT-1, LBT-3, LBT-4, LBT-12, LBT-24, LBT-26, LBT-32, LBT-35, LBT-47, LBT-49	100% a
LBT-14	96,0% a
LBT-25	96,0% a
LBT-2	92,0% a
LBT-20	90,7% a
LBT-23	89,4 % ab
LBT-5	84,1% ab
LBT-46	65,0% b
LBT-48	34,9% c
LBT-50	11,6% c
LBT-6, LBT-8, LBT-10, LBT-13, LBT-16, LBT-19, LBT-21, LBT-27, LBT-29, LBT-30, LBT-31, LBT-33, LBT-34, LBT-40 LBT-45, LBT-55, LBT-56, LBT-59	0% d

Notas: ^z Datos expresados en porcentaje de la reducción con respecto al testigo; medias con letras desiguales difieren significativamente según prueba de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$); $s = 3,65$; CV (%) = 15,1.

La mayoría de las cepas efectivas presentaron cristales bipiramidales y en su mayoría tienen asociadas inclusiones cúbicas, concordando con Carreras (2003), excepto en las cepas LBT-20 y LBT-25, donde se observaron cristales cuadrados y amorfos, respectivamente. Por otra parte, las cepas menos eficaces también presentaron cristales bipiramidales, y solamente tuvieron inclusiones cúbicas. También coincidió la presencia de un cristal cuadrado observado en la cepa LBT-6.

Lo anterior sugiere que la especificidad observada y la forma del cristal no son criterios que indiquen categóricamente la toxicidad de la bacteria. Hoy en día la morfología del cristal se utiliza como criterio de caracterización de la cepas de *B. thuringiensis*, conjuntamente con otros métodos (Kim 2000). No hay informes que indiquen la morfología característica de los cristales de las cepas de *B. thuringiensis* con actividad nematocida; tampoco ha sido posible caracterizarlas en nematodos de vida libre, utilizados frecuentemente en modelos para bioensayos con esta bacteria.

En todas las cepas que mostraron actividad biológica sobre *M. incognita* predominó la variedad *kurstaki*, excepto las cepas LBT-20 y LBT-25, que pertenecen a las variedades *morrisoni* e *israelensis*, respectivamente, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Meadows et ál. (1990),

Cuadro 2. Juveniles eclosionados de *Meloidogyne incognita* en contacto con agua destilada después de los tratamientos con *Bacillus thuringiensis*

Cepas	Valor promedio de J2			
	7 días		15 días	
LBT-1	0,5	f	0,5	e
LBT-2	29,5	d	54,0	d
LBT-3	11,0	e	13,0	e
LBT-4	10,0	e	10,5	e
LBT-5	47,5	c	159,5	b
LBT-12	62,0	b	81,0	c
LBT-14	53,0	c	89,0	c
LBT-20	5,0	f	93,0	c
LBT-23	35,0	d	41,0	d
LBT-24	6,0	f	11,5	e
LBT-25	3,5	f	15,0	e
LBT-26	20,5	e	55,5	d
LBT-32	1,0	f	68,0	cd
LBT-35	46,0	c	109,5	b
LBT-47	0,0	f	18,0	e
LBT-49	79,5	a	205,0	a
Control	124,0	a	227,0	a
	s = 9,0		s = 11 0	
	CV (%) =11,3		CV (%) = 14,8	

Notas: Datos expresados en porcentaje de reducción respecto al testigo. Medias con letras desiguales dentro de cada columna difieren significativamente para la prueba de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

donde las toxinas de variedad *israelensis* mostraron mayor actividad en el nematodo de vida libre *Turbatrix aceti* en comparación con las variedades *kurstaki* y *morrisoni*.

Se conoce que algunas especies de nematodos han sido susceptibles a variedades de *B. thuringiensis*. Alrededor de 30 serovares resultaron tóxicos a huevos del nematodo zooparásito *Trichostrongylus colubriformis*, con una DL_{50} en el rango de 0,09 a 7,1 μg de proteína mL^{-1} (Pinnock 1994). En el mismo estudio, huevos de otras seis especies de nematodos de vida libre y zooparásitos fueron reportados susceptibles a la variedad *israelensis*, con una DL_{50} en un rango de 0,38 a 7,1 μg de proteína mL^{-1} (Pinnock 1994).

Experimentos realizados por Sharma (1994) mostraron diferencias en los niveles de control de *M. incognita* entre las variedades *thuringiensis* y *kurstaki* (53-65%); no se detectaron diferencias significativas entre parámetros como la altura, peso fresco de la raíz y de la planta con respecto al testigo.

Muchos autores han relacionado las variedades de *B. thuringiensis* con su actividad biológica específica y se informa que *kurstaki*, *aizawai*, *thuringiensis*, *alesti* y *dendrolimus/sotto* son tóxicas para lepidópteros. *B. thuringiensis* var. *israelensis* y *B. thuringiensis* var.

darmstadiensis son tóxicos para dípteros. *B. thuringiensis* var. *tenebrionis* y *japonesis* son activos contra coleópteros (Lecadet et ál. 1999). La determinación de las variedades no relaciona directamente la actividad biológica de las cepas, pues no refleja el tipo de gen cry que contiene la bacteria (Park et ál. 1998).

Determinación de la estabilidad del efecto de *B. thuringiensis* sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*

El efecto reversible fue otro criterio para seleccionar entre aquellas cepas del primer tamizaje que redujeron en más de un 80% la eclosión de los huevos. A los 7 y 15 días de evaluación, en las cepas LBT-2, LBT-5, LBT-12, LBT-14, LBT-23, LBT-26, LBT-35 y LBT-49 el efecto nematocida se perdió o fue muy bajo en los primeros 7 días en relación con el testigo (Cuadro 2).

En las cepas LBT-20 y LBT-32 el efecto se redujo a los 15 días, observándose valores más altos de larvas eclosionadas que en la evaluación anterior. Este resultado es importante si tomamos en consideración que en condiciones de campo debe lograrse que las cepas utilizadas tengan efectos razonablemente estables, asumiendo que la toxicidad es relativa y puede cambiar de acuerdo con las condiciones ambientales (Sims 1997). Con las cepas LBT-1, LBT-3, LBT-4, LBT-24, LBT-25 y LBT-47 el efecto se mantuvo hasta los 15 días, con los menores valores de juveniles eclosionados al compararlas con el resto de las cepas evaluadas.

Los resultados obtenidos coinciden con lo señalado por Chahal y Chahal (1993), quienes transfirieron masas de huevos de *M. incognita* a agua luego de ser mantenidas en Thuricide 0,25% - 1% (*B. thuringiensis* var. *kurstaki*), sin observar la emergencia de juveniles.

El desarrollo embrionario de *M. incognita* se vio afectado por cepas de *B. thuringiensis* seleccionadas a partir del segundo ensayo in vitro. Los síntomas observados se caracterizaron por la deformación y detención del proceso embrionario de los huevos; algunos de ellos se encontraban en estado necrótico. Los juveniles presentaron vacuolización interna, deformaciones en el sistema digestivo y ausencia de respuesta ante estímulos luminosos.

De acuerdo con Aroian (2002), los daños provocados por acción de las toxinas de *B. thuringiensis* juveniles de *Caenorhabditis elegans* se manifestaron como constricciones y vacuolizaciones en el intestino; estos cambios estructurales sucedieron a tres horas de haber estado en contacto el nematodo con la bacteria.

Es importante recordar que los huevos de los nematodos están protegidos por una pared que consiste de lípidos, carbohidratos y proteínas, mientras que el principal

componente de las larvas son las proteínas, generalmente permeables a los gases (Mena 2001).

Botjer y Bone (1985) demostraron el efecto de *B. thuringiensis* var. *israelensis* sobre *T. colubriformis*. La acción de una toxina producida por la bacteria tuvo efectos similares a los producidos por sustancias detergentes, causando degradación de la capa lipídica y alteración de la permeabilidad de los huevos. Los mismos autores detectaron la aparición en los huevos de fragmentos electrodensos adosados a la superficie interna de la capa de quitina, asociados a procesos degenerativos que sufren las membranas tanto en la pared del huevo como de los embriones en desarrollo.

La posible alteración de la permeabilidad podría inducir a cambios inapropiados en la osmosis o flujo iónico, influyendo en la viabilidad de los huevos tratados (Bone et ál. 1988). La presencia de vacuolas puede originar muerte por asfixia, observada en nematodos que crecen en un medio natural donde existen gases antagonistas (Mena 2004). Se ha descrito que algunas especies de nematodos utilizan sus reservas de grasas durante períodos de incubación con *B. thuringiensis* var. *israelensis*, y se ha determinado la ineficacia de las larvas en relación con la presencia de reservas lipídicas (Mencho 2001).

Determinación de las fracciones tóxicas con actividad biológica

La mayor reducción en la eclosión de las masas de huevos tratadas se alcanzó con los sobrenadantes de las cepas

LBT-1, LBT-3, LBT-24, LBT-25 y LBT-47. La actividad tóxica de esta fracción sobre los huevos se mantuvo al evaluarse el efecto reversible y no observar la emergencia de juveniles en ninguna de las cepas durante los 15 días de evaluación (Figura 1).

No hubo diferencias significativas entre el cultivo completo y el sobrenadante de las cepas LBT-1, LBT-3 y LBT-24. Las tres fracciones probadas de la cepa LBT-25 no difirieron entre sí, ejerciendo un efecto similar sobre la eclosión de los huevos de *M. incognita*.

Las fracciones de los cultivos completos y el precipitado formado por el complejo espora-cristal tuvieron un efecto significativo en la eclosión de los huevos con la cepa LBT-4. Otros autores han indicado resultados similares: Leyns et ál. (1995) demostraron la actividad nematocida utilizando mezclas de esporas y cristales de aislados de *B. thuringiensis* contra juveniles y adultos de *C. elegans*, mientras que en estudios previos, utilizando fracciones ricas en cristales, la actividad ovicida fue atribuida a la proteína cristal (Botjer et ál. 1985; Meadows et ál. 1989, 1990). Narva et ál. (1991), en un estudio con preparaciones comerciales de *B. thuringiensis*, consideraron que la actividad nematocida podía deberse a la acción de las δ -endotoxinas.

Los resultados sugieren que las exotoxinas termoestables del sobrenadante tuvieron mayor efectividad (tóxica) cuando se ensayaron las cepas LBT-1, LBT-3, LBT-24, LBT-25 y LBT-47, sin apreciarse diferencias significativas entre ellas. Esto confirmó las observaciones

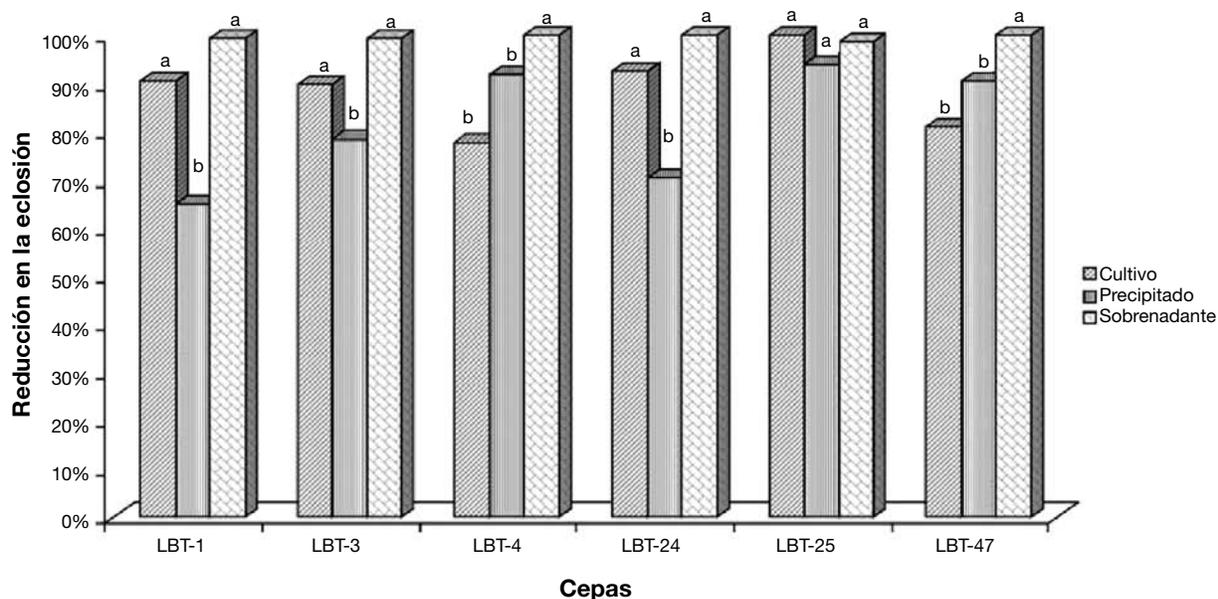


Figura 1. Efecto de las fracciones de cepas de *Bacillus thuringiensis* sobre la eclosión de los huevos de *Meloidogyne incognita*. Medias con letras desiguales difieren significativamente para la prueba de Newman-Keuls ($p \leq 0,05$).

realizadas por Prasad et ál. (1972), Noel (1990) y Singer et ál. (1994), quienes relacionaron la toxicidad de cepas de *B. thuringiensis* contra nematodos con la producción de exotoxinas extracelulares, liberadas en el sobrenadante del medio de cultivo.

Las especies susceptibles a la β -exotoxina pueden ser afectadas mediante la ingestión o la inyección de la toxina, aunque hay algunas especies susceptibles al contacto, como algunas moscas y ácaros, donde las concentraciones subletales provocan un retardo en el desarrollo de las larvas y efectos teratogénicos en larvas y pupas (Gohar y Perchat 2001).

Noel (1990) ha informado sobre los efectos nematostáticos y nematocidas de *B. thuringiensis* causados únicamente por la β -exotoxina sobre *Meloidogyne incognita* y *Heterodera glycines*.

Zuckerman et ál. (1993) reportaron la eficacia de una cepa de *B. thuringiensis* contra *M. incognita* y *Rotylenchus reniformis* en experimentos de campo y en condiciones semicontroladas. Las aberturas del cuerpo de estos nematodos son muy pequeñas como para permitir la penetración de la bacteria, por lo que sugirieron que el modo de acción podía atribuirse a la exotoxina o a una δ -endotoxina muy específica, liberada con la lisis celular.

Carneiro et ál. (1998) informaron en sus estudios con diferentes cepas de *B. thuringiensis* acerca de la actividad nematocida sobre juveniles de *M. javanica*, determinando que los mayores porcentajes de mortalidad y efectos tóxicos que provocaron inmovilización de las larvas y ausencia de recuperación de las mismas en agua destilada estaban relacionados con la presencia de exotoxinas encontradas en el sobrenadante tratado a 120 °C por 15 min, no así cuando evaluaron la mortalidad empleando una suspensión de esporas y cristales.

En el mercado hay formulaciones comerciales que contienen solamente la δ -endotoxina que arrojan resultados positivos (Meadows et ál. 1990, Sharma 1994). Por otra parte, se ha demostrado el impacto de formulaciones a base de exotoxinas de *B. thuringiensis* en el desarrollo y multiplicación de diferentes especies de nematodos de vida libre (Shevtsov et ál. 1996).

El pequeño tamaño de los estiletos de los nematodos imposibilita que estos ingeran los cristales tóxicos y se desencadene todo el mecanismo de acción propio de las δ -endotoxinas. Por tanto, al no predisolverse esta toxina, resulta difícil comprender que la actividad nematocida de *B. thuringiensis* se origine en ellas, por lo cual el criterio más actualizado está encaminado a explicar la actividad nematocida a partir de las exotoxinas de *B. thuringiensis* (Glare y O'Callaghan 2000).

Literatura citada

- Aroian, R; Griffiths, J; Wei, J; Hale, K; Chien, K; Mac Donald, K. 2002. *B. thuringiensis* toxin and nematodes: mechanism of resistance and toxicity. International Conference on *B. thuringiensis* (ICBt) (6, Brasil, 2002). Proceedings. Brasil, EMBRAPA. s.p.
- August, J; Schwab, GE; Payne, JM. 1994. Genes encoding nematode-active toxins cloned from *Bacillus thuringiensis* isolate PS17. Patent number 5281530. Mycogen Corporation.
- Bone, LW; Botter, KP; Gilol, SS. 1988. Factors affecting the larvicidal activity of *B. thuringiensis* toxin for *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). J. Invert. Pathol. 52:102-107.
- Botjer, KP; Bone, LW; Gill, SS. 1985. Nematoda: susceptibility of the egg to *Bacillus thuringiensis* toxins. Exp. Parasit. 60:239-244.
- Boucias, DG; Pendland, JC. 1998. Principles of insect pathology. Norwel, US, Klumer Academic Publishers. p. 75-84.
- Carneiro, RMDG; Souza, IS; Belarmino, LC. 1998) Atividade nematocida de cepas de *Bacillus* spp. a juvenis de *Meloidogyne javanica*. Nematología Brasileira 22(1):12-21.
- Carreras, B. 2003. Caracterización de cepas de *Bacillus thuringiensis* para el control fitosanitario. Tesis Mag. Sc. Ciudad de la Habana, CU, Universidad de la Habana. Dpto de Microbiología. 66 p.
- Chahal, PPK; Chahal, VPS. 1993. Effect of Thuricide on the hatching of eggs of root-nematode (*Meloidogyne incognita*). Curr. Nematol. 4:247.
- Eisenback, JD. 1985. Diagnostic characters in the identification of the four most common species of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). In Sasser, JN; Carter, CC. eds. An advanced treatise on *Meloidogyne* Biology and control. Estados Unidos, NC State University- USAID. v. 1, p. 95-112.
- Flores, J; Mendoza, P; López, ME; Herrera, D, Bravo, MA; Vázquez, V; Liébano, E. 2000. *Bacillus thuringiensis*: una alternativa en el control de nematodos gastroentéricos en la ganadería. Congreso Nacional de Control Biológico (23, Guanajuato, MX, 2000). Memorias. p. 21-23.
- Glare, TR; O'Callaghan, M. 2000. *Bacillus thuringiensis*. Biology, ecology and safety. Reino Unido, Wiley and sons. 350 p.
- Gohar, M; Perchat, S. 2001. Sample preparation for beta exotoxin determination in *B. thuringiensis* cultures by reversed phase high performance liquid chromatography. Anal. Biochem. 298:112-117.
- Kim, HS. 2000. Comparative study of frequency, flagellar serotype, crystal shape, toxicity, and cry gene contents of *Bacillus thuringiensis* three environments. Curr. Microbiol. 41(4):250-256.
- Lecadet, M; Sarchis, M; Lereclus, D. (1999) Updating the H- antigen classification of *B. thuringiensis*. J. App. Microbiol. 86:660-673.
- Leyns, F; Borgonie, G; Arnaut, G; De Waele, D. 1995. Nematicidal activity of *B. thuringiensis* isolates. Fundam. Appl. Nematol. 18(3):211-18.
- Meadows, JR; Gill, SS; Bone, LW. 1990. *B. thuringiensis* strains affects population growth of the free living nematode *Torbatrrix aceti*. Invert. Reprod. and Devel. 17:73-76.
- Meadows, JR; Gill, SS; Bone, LW. 1989. Lethality of *Bacillus thuringiensis morrisoni* for eggs of *Trichostrongylus colubriformis* (Nematoda). Inter. J. Invertebr. Reprod. Develop. 15:159-161.
- Mena, J. 2001. Empleo de *Bacillus thuringiensis* var *kurstaki* en el control de nematodos en plantaciones de plátano y banano. Nematropica 31(2):145-150.

- Mena, J. 2004. Determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Tesis Ph. D. Universidad Central de las Villas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Camagüey. 120 p.
- Mencho, JD. 2001. Comunicación personal. MES. Universidad de Camagüey, Fac. de Veterinaria, Circunvalación Norte Km 5 ½. Código postal 74650.
- Narva, KE; Payne, J; Schwar, GJ; Hickle, LA; Galasan, T; Sick, AJ. 1991. Novel *B. thuringiensis* microbes active against nematodes, and genes encoding novel nematode-active toxins cloned from *B. thuringiensis* isolates. European Patent Application 91305047.2.
- Noel, GR. 1990. Evaluation of thuringiensin of *H. glycines* on Soybean. *J. Nematol.* 22(4s):763-766.
- Park, HW; Roh, JY; Je, YH; Kang, SK. 1998. Isolation of a non insecticidal *B. thuringiensis* isolate PS17. Patent number 5281530. Mycogen Corporation.
- Pinnock, DE. 1994. The use of *Bacillus thuringiensis* for control of pests of livestock. *Agri. Ecosys. Environ.* 49:59-63.
- Prasad, S; Tilak, K; Gollakota, KG. 1972. Role of *Bacillus thuringiensis* var. *thuringiensis* on the larval survivability and egg hatching of *Meloidogyne* spp., the causative agent of root knot disease. *J. Invertebr. Pathol.* 20:377-378.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2 ed. New York, US, Cold Spring Harbor Laboratory Press. 132 p.
- Sharma, RD. 1994. *B. thuringiensis*: a biocontrol agent of *Meloidogyne incognita* on Barley. *Nemat. Brasileira* 18:79-84.
- Shevtsov, V; Shhyolokova, E; Krainova, O; Jigletsova, S; Ichtchenko, V. 1996. Application horizons of crystalliferous bacilli for the control of pest insects, nematodes and mosquitoes. *Bull. OILB-SROP* 19:289-292.
- Siddiqui, IA. 2002. Suppression of *M. javanica* by *Pseudomonas aeruginosa* and *B. subtilis* in tomato. *Nematol. Medit.* 30:125-130.
- Sims, SR. 1997. Host activity spectrum of the Cry IIA protein: effects on the Lepidoptera, Diptera and non target arthropods. *Southwestern Entomology* 22:395-404.
- Singer, S; Cadwallader, H; Owens, A; Rives, J. 1994. Biocontrol of phytoparasitic nematodes (Heterodera glycines) by strains of morphological group II. *Bacillus International Colloquium Pathology and Microbial Control (Montpellier, Francia)*. Abstracts. INRA. p. 281.
- Statitcf: Versión 4.0, 1998.
- Zuckerman, BM; Dickow, MB; Acosta, N. 1993. A strain of *B. thuringiensis* for the control of plant parasitic nematodes. *Biocontrol of Sciences and Technologies* 3(1):41-46.
- Zuckerman, BM; Dicklow, M; Marban-Mendoza, N. 1995. Nematocidal *Bacillus thuringiensis* biopesticide. U.S. Patent. A01-N-63/00.