

## Identification of Cry1 genes in *Bacillus thuringiensis* isolates and their toxic effect against *Milax gagates*, a pest on lettuce (*Lactuca sativa*)

## Identificación de genes Cry1 en aislados de *Bacillus thuringiensis* y su efecto tóxico contra *Milax gagates*, plaga en lechuga (*Lactuca sativa*)

Fabian Galvis<sup>1\*</sup>; Laura Moreno<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Santander, Grupo de Investigación Biogen. Avenida 4 núm. 10N-61, San José de Cúcuta, Norte de Santander, C. P. 540003, COLOMBIA.

<sup>2</sup>Universidad Francisco de Paula Santander, Grupo de Investigación Majumba. Avenida Gran Colombia núm. 12E-96, Barrio Colsag, San José de Cúcuta, Norte de Santander, C. P. 540003, COLOMBIA.

\*Corresponding author: fgs999@hotmail.com

### Abstract

*Milax gagates* is one of the main pests in the cultivation of lettuce, causing considerable economic losses. Control with molluscicides totally or partially eliminates the pest but generates a negative impact on the environment due to their high toxicity. Biological management also allows controlling the pest, but in a specific and safe way for the environment. Therefore, the objective of this work was to evaluate the toxic effect of *Bacillus thuringiensis*, with Cry1 genes, against *M. gagates* by means of a bioassay. Seventy-five soil samples were taken from several municipalities in Norte de Santander, Colombia, from where 58 isolated colonies of *B. thuringiensis* with similar characteristics were obtained. Of these colonies, five showed the presence of Cry1 genes, and were those used in the bioassays together with the control *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*. The treatments caused 90-100 % lethality to *M. gagates* at a concentration of 500 µg·mL<sup>-1</sup>. The calculated LD99 suggests the use of 820 µg·mL<sup>-1</sup> of the biopreparate to obtain 100 % lethality with any of the five isolates studied.

**Keywords:** biological control, slugs, molluscicides, bioassays.

### Resumen

*Milax gagates* constituye una de las principales plagas en el cultivo de lechuga causando considerables pérdidas económicas. El control con molusquicidas elimina total o parcialmente la plaga, pero genera un impacto negativo en el ambiente por su alta toxicidad. El manejo biológico también permite el control de la plaga, pero de manera específica e inocua para el ambiente. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto tóxico de *Bacillus thuringiensis*, con genes Cry1, contra *M. gagates* mediante la elaboración de un bioensayo. Se tomaron 75 muestras de suelo de varios municipios del Norte de Santander, Colombia, de donde se obtuvieron 58 colonias aisladas de *B. thuringiensis* con características similares. De estas colonias, cinco evidenciaron la presencia de genes Cry1, y fueron las empleadas en los bioensayos junto con el control *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*. Los tratamientos presentaron letalidad ante *M. gagates* de entre 90 y 100 % a una concentración de 500 µg·mL<sup>-1</sup>. La CL99 calculada sugiere el uso de 820 µg·mL<sup>-1</sup> del biopreparado para obtener 100 % de letalidad con cualquiera de los cinco aislados estudiados.

**Palabras clave:** control biológico, babosas, molusquicidas, bioensayos.



## Introduction

Lettuce (*Lactuca sativa* L.) is one of the most used vegetables for food preparation due to its content of water, polyphenols, carotenoids, fiber, Ca, Fe, K, and vitamins A, C and E (Vargas-Arcila et al., 2017). According to data from the Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT, 2014), global production of lettuce in 2014 was 24,976,317 t, with China being the main producer with 13,657,570 t, followed by the United States with 3,791,140 t; Mexico and Chile rank 9<sup>th</sup> and 19<sup>th</sup> with 406,678 and 89,544 t, respectively. The Ministry of Agriculture of Colombia recorded that lettuce production in this country went from 23,038 t in 2007 to 83,643 t in 2014, increasing the planted area three times.

The lettuce crop is severely damaged by attacks by pests such as *Trialeurodes vaporariorum* (whitefly) and *Milax gagates* (slugs), which affect production and quality, causing great economic losses. *M. gagates* and other gastropods are vectors of parasites such as *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, *Angiostoma margaretae* and *Criptosporidium parvum*, which cause various diseases in humans (Neira, Muñoz, Stanley, Gosh, & Rosales, 2010).

The methods used to manage slugs in lettuce crops include cultural, biological and chemical control, which partially or totally eliminate the pest. As a biological control, the *Phasmarhabditis hermaphrodita* nematode is mainly used, and the most-used chemical options are molluscicides (metaldehydes and carbamates) that cause environmental damage due to their high toxicity (Garavano et al., 2013).

Biopesticides offer useful alternatives for pest control, such as their specificity and harmlessness to the environment and human beings. *Bacillus thuringiensis* is the most widely used biocontroller and accounts for approximately 90 % of the biopesticide market. During sporulation, *B. thuringiensis* produces proteic-type parasporal crystalline inclusion with insecticidal activity called Cry proteins (Hung et al., 2016). This bacterium acts mainly on the orders *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera* and *Mallophaga*, although activity has also been reported against nematodes, mites and some tumor lines (Rojas-Arias, López-Pazos, & Chaparro-Giraldo, 2013; Bravo et al., 2017).

In general, about 950 different genes have been identified for toxins, distributed in different groups: 74 of Cry proteins, 3 of Cyt proteins and 3 of Vip proteins (Crickmore, 2017). Cry proteins are classified according to the primary amino acid sequence (Crickmore, Bone, Williams, & Ellar, 1995). Several studies have shown the insecticidal activity of Cry1 proteins on *Lepidoptera*,

## Introducción

La lechuga (*Lactuca sativa* L.) es una de las hortalizas más utilizadas para la preparación de alimentos debido a su contenido de agua, polifenoles, carotenoides, fibra, Ca, Fe, K, y vitaminas A, C y E (Vargas-Arcila et al., 2017). De acuerdo con datos de la *Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database* (FAOSTAT, 2014), la producción mundial de lechuga en 2014 fue de 24,976,317 t, siendo China el principal productor con 13,657,570 t, seguido por Estados Unidos con 3,791,140 t; México y Chile ocupan el 9 y 19 lugar con 406,678 y 89,544 t, respectivamente. El ministerio de Agricultura de Colombia registró que la producción de lechuga en este país pasó de 23,038 t en 2007 a 83,643 t en 2014, aumentando tres veces el área sembrada.

El cultivo de lechuga es dañado seriamente por el ataque de plagas como *Trialeurodes vaporariorum* (mosca blanca) y *Milax gagates* (babosas), que afectan la producción y calidad, causando grandes pérdidas económicas. *M. gagates* y otros gasterópodos son vectores de parásitos como *Angiostrongylus costaricensis*, *A. cantonensis*, *Angiostoma margaretae* y *Criptosporidium parvum*, causantes de diversas enfermedades en humanos (Neira, Muñoz, Stanley, Gosh, & Rosales, 2010).

Los métodos utilizados para el manejo de babosas en cultivos de lechuga incluyen el control cultural, biológico y químico, que eliminan parcial o totalmente la plaga. Como control biológico se emplea principalmente el nemátodo *Phasmarhabditis hermaphrodita* y en el químico se utilizan los moluscicidas metaldehído y carbamatos que generan daños en el ambiente por su elevada toxicidad (Garavano et al., 2013).

Los biopesticidas ofrecen alternativas útiles para el control de plagas, como su especificidad e inocuidad para el medio ambiente y seres humanos. *Bacillus thuringiensis* es el biocontrolador más utilizado y representa aproximadamente 90 % del mercado de biopesticidas. Durante la esporulación *B. thuringiensis* produce inclusiones cristalinas paraesporales de tipo proteico con actividad insecticida denominadas proteínas Cry (Hung et al., 2016). Esta bacteria actúa principalmente sobre los órdenes *Lepidoptera*, *Diptera*, *Coleoptera*, *Hymenoptera*, *Homoptera*, *Orthoptera* y *Mallophaga*; aunque también se ha reportado actividad contra nemátodos, ácaros y algunas líneas tumorales (Rojas-Arias, López-Pazos, & Chaparro-Giraldo, 2013; Bravo et al., 2017).

En general, se han identificado alrededor de 950 genes diferentes para toxinas, distribuidos en diferentes grupos: 74 de proteínas Cry, 3 de proteínas Cyt y 3 de proteínas Vip (Crickmore, 2017). Las proteínas Cry se clasifican de acuerdo con la secuencia primaria de aminoácidos (Crickmore, Bone, Williams, & Ellar,

and other orders of insects and gastropods (Gao, Li, Dai, Wu, & Yi, 2008; van Frankenhuyzen, 2013).

Due to the negative environmental impact caused by the use of chemicals for the management of *M. gagates* in the cultivation of *L. sativa*, the implementation of other control alternatives is sought; therefore, the aim of this research was to evaluate the toxic effect of *B. thuringiensis* isolates, identified with Cry1 genes, on *M. gagates* through a bioassay.

## Materials and methods

### Biological material

Seventy-five soil samples were taken from the municipalities of Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano and Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia, which presented a clay-sandy texture and a pH between 4.3 and 9.8. From the soil samples, 236 colonies were isolated that showed morphological characteristics corresponding to *B. thuringiensis*: flattened, circular colonies of 6 to 8 mm in diameter, with an irregular, lobed and arborescent border, soft consistency, opaque/matt appearance, creamy white pigmentation and bacteria with morphology pertaining to straight bacilli with round or blunt ends (Galvis-Serrano, 2013).

Of the total isolates, 172 colonies were selected as Gram positive, of which 58 had non-deforming cylindrical or ovoid spores of the body of the bacillus in terminal or subterminal position and with the presence of parasporal crystal. The 58 isolated colonies were identified as *B. cereus* by the BBL™ CRYSTAL™ Gram positive/GP system. *B. cereus* and *B. thuringiensis* are biochemically identical and differ only in the production of parasporal crista, so we used T3 medium, which contains per liter 3 g of tryptone, 2 g of tryptose, 1.5 g of yeast extract, 6.9 g of sodium phosphate and 0.005 g of MnCl (Khodabandeh, Safaralizadeh, Safavi, & Aramideh, 2014), for the release of spores and crystals of all isolates and controls used in the bioassay.

For the bioassay, 1,000 *M. gagates* individuals were collected and the 58 isolated colonies of *B. thuringiensis* (Bt1 to Bt58) identified microbiologically and biochemically were used. As a positive control, the *B. thuringiensis* var. Kurstaki strain isolated from the commercial product Turilav® was used.

### Isolation of *B. thuringiensis*

To isolate the bacterium, 500 mg of soil were added to 10 mL of sterile distilled water and incubated at 65 °C for 30 min with vigorous stirring. Subsequently, 100 µL of each sample were inoculated in solid LB medium (10 g of tryptone, 10 g of NaCl, 5 g of yeast

1995). Diversos trabajos han evidenciado la actividad insecticida de las proteínas Cry1 sobre *Lepidoptera*, y otros órdenes de insectos y gasterópodos (Gao, Li, Dai, Wu, & Yi, 2008; van Frankenhuyzen, 2013).

Debido al impacto negativo en el ambiente generado por el uso de químicos para el manejo de *M. gagates* en el cultivo de *L. sativa* se busca la implementación de otras alternativas de control; por lo que el objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto tóxico de aislados de *B. thuringiensis*, identificados con genes Cry1, sobre *M. gagates* mediante la elaboración de un bioensayo.

## Materiales y métodos

### Material biológico

Se tomaron 75 muestras de suelo de los municipios Cúcuta, El Zulia, Los Patios, San Cayetano y Villa del Rosario, Norte de Santander, Colombia, las cuales presentaron una textura arcillo-arenosa y un pH entre 4.3 y 9.8. A partir de las muestras de suelo se aislaron 236 colonias que mostraron características morfológicas correspondientes a *B. thuringiensis*: colonias circulares de 6 a 8 mm de diámetro, aplanadas, de borde irregular lobulado y arborescente, consistencia blanda, aspecto opaco/mate, pigmentación blanco cremoso y bacterias con morfología perteneciente a bacilos rectos de extremos redondos o romos (Galvis-Serrano, 2013).

Del total de los aislados se seleccionaron 172 colonias como Gram positivas, de las cuales 58 presentaron esporas de forma cilíndrica u ovoide no deformante del cuerpo del bacilo en posición terminal o subterminal y con la presencia de cristal paraesporal. Las 58 colonias aisladas fueron identificadas como *B. cereus* mediante el sistema BBL™ CRYSTAL™ Gram positivo/GP. *B. cereus* y *B. thuringiensis* son bioquímicamente idénticos y se diferencian únicamente por la producción de crista paraesporal, por lo que se empleó el medio T3, que contiene por litro 3 g de triptona, 2 g de triptosa, 1.5 g de extracto de levadura, 6.9 g de fosfato de sodio y 0.005 g de MnCl (Khodabandeh, Safaralizadeh, Safavi, & Aramideh, 2014), para la liberación de esporas y cristales de todos los aislados y controles empleados en el bioensayo.

Para el bioensayo se colectaron 1,000 individuos de *M. gagates* y se utilizaron las 58 colonias aisladas de *B. thuringiensis* (Bt1 a Bt58) identificadas microbiológica y bioquímicamente. Como control positivo se usó la cepa de *B. thuringiensis* var. Kurstaki aislada del producto comercial Turilav®.

### Aislamiento de *B. thuringiensis*

Para aislar la bacteria se adicionaron 500 mg de suelo en 10 mL de agua destilada estéril y se incubaron a 65 °C

extract and 15 g of agar per liter) and incubated at 28-30 °C for 24 h (Galvis-Serrano, 2013). The grown colonies were examined and selected by their appearance and morphology by observation under a stereoscopic microscope. The bacillary shape, distention of the sporangium, location, morphology of the spore and presence of parasporal crystal were determined by differential staining with malachite green.

### Molecular identification

The DNA of the isolates and the positive control was obtained with the UltraClean® Microbial DNA Isolation kit from the MoBio company. For the molecular identification of Cry1 genes by means of polymerase chain reaction (PCR), the primers proposed by Djenane et al. (2017) were used: Un1(f) CATGATTCATGCGGCAGATAAAC and Un1(r) TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT. The final volume of the mixture for PCR was 50 µL, and contained 1X of DNA polymerase buffer, 200 µM of dNTP, 1 U of DNA polymerase, 1 µM of each primer and 2 µL of DNA. The amplification conditions were: 95 °C for 5 min for initial denaturation, followed by 30 cycles of 95 °C for 1 min, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 7 min. The PCR products were visualized on 1 % agarose gels stained with ethidium bromide.

### Bioassay

**Maintenance of *M. gagates*.** Twenty-five polypropylene boxes (17 x 10 x 10 cm) with perforated lids covered with mesh cloth were used. Each box contained 70 g of sterile moist soil and 30 g of fresh lettuce (*L. sativa* var Capitata) replaced every 48 h. Between 30 to 50 slugs were placed in each box. The average temperature of each box was 25 °C.

**Daily diet.** A test was conducted to determine the daily lettuce intake of *M. gagates*, for which 10 polystyrene (icopor) containers with perforated lids covered with mesh cloth were used. In each container, 20 g of sterile moist soil, 4 g of lettuce per day and one individual of *M. gagates*, weighing approximately 800 mg, were added; each container was kept at 25 °C on average. The lettuce was weighed every 24 h for seven days to establish the amount consumed.

**Bacterial formulation.** To obtain the spore-crystal complex, the PCR-identified isolates of the Cry1 genes and the control *B. thuringiensis* var *Kurstakii* were used, inoculated in 100 mL of T3 medium (Khodabandeh et al., 2014) and placed under stirring for 10 days at 30 °C. Subsequently, the culture was centrifuged at 3,500 g for 15 min and three consecutive washes were carried out with 1.5 M NaCl, eliminating the supernatant at each opportunity. The final precipitate was frozen and

por 30 min con agitación vigorosa. Posteriormente, se inocularon 100 µL de cada muestra en medio LB sólido (10 g de triptona, 10 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 15 g de agar por litro) y se incubaron a 28-30 °C durante 24 h (Galvis-Serrano, 2013). Se examinaron las colonias crecidas y se seleccionaron por su aspecto y morfología mediante observación al microscopio estereoscópico. Se determinó la forma bacilar, distensión del esporangio, localización, morfología de la espora y presencia del cristal parasporal mediante la tinción diferencial con verde malaquita.

### Identificación molecular

El ADN de los aislados y el control positivo se obtuvo con el kit UltraClean® *Microbial DNA Isolation* de la casa comercial MoBio. Para la identificación molecular de genes Cry1 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) se emplearon los cebadores propuestos por Djenane et al. (2017): Un1(f) CATGATTCATGCGGCAGATAAAC y Un1(r) TTGTGACACTTCTGCTTCCCATT. El volumen final de la mezcla para la PCR fue de 50 µL, y contenía 1X de buffer de la ADN polimerasa, 200 µM de dNTP, 1 U de ADN polimerasa, 1 µM de cada cebador y 2 µL de ADN. Las condiciones de amplificación fueron: 95 °C por 5 min para la desnaturalización inicial, seguida de 30 ciclos de 95 °C por 1 min, 60 °C por 30 s y 72 °C por 1 min, y una extensión final a 72 °C por 7 min. Los productos de la PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1 % teñidos con bromuro de etidio.

### Bioensayo

**Mantenimiento de *M. gagates*.** Se utilizaron 25 cajas de polipropileno (17 x 10 x 10 cm) con tapas perforadas cubiertas con tela de malla. A cada caja se le adicionaron 70 g de tierra húmeda estéril y 30 g de lechuga fresca (*L. sativa* var Capitata) remplazada cada 48 h. Se colocaron entre 30 a 50 babosas por caja. La temperatura promedio de cada caja fue de 25 °C.

**Dieta diaria.** Se realizó un ensayo para determinar la ingesta de lechuga por día de *M. gagates*, para lo cual se utilizaron 10 recipientes de poliestireno (icopor) con tapas perforadas cubiertas con tela de malla. En cada recipiente se agregaron 20 g de tierra húmeda estéril, 4 g de lechuga por día y un individuo de *M. gagates*, con un peso aproximado de 800 mg, y se mantuvieron a 25 °C en promedio. La lechuga se pesó cada 24 h durante siete días para establecer la cantidad consumida.

**Formulación bacteriana.** Para la obtención del complejo espora-cristal se emplearon los aislados identificados por la PCR de los genes Cry1 y el control *B. thuringiensis* var *Kurstakii*, los cuales se inocularon en 100 mL de

lyophilized. To carry out the bioassays, the lyophilisate was resuspended in sterile distilled water until reaching a concentration of  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Carmona, 2002).

**Toxicity test.** There are reports with different concentrations of product from *B. thuringiensis* isolates with Cry1 genes, where the most widely used ranges are from 2 to  $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  and from 0.5 to  $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  of spore-crystal complex (Galvis-Serrano, 2013; Ibarra et al., 2003; Monnerat et al., 2007; Peña et al., 2006; Pitre, Hernández-Fernández, & Bernal, 2008; Schünemann, Knaak, & Fiuza, 2014). According to the previous information, four concentrations of *B. thuringiensis* lyophilisate (125, 250, 375 and  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) were tested in this work to evaluate their toxic effect on *M. gagates*. Two bioassays were performed at different times for each isolate and control.

No published data proving the toxic effect of *B. thuringiensis* on *M. gagates* were found; however, there are studies on the toxicity of *B. thuringiensis* on other slug species and snails using commercial preparations at concentrations of  $0.2$  to  $2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  with lethality between 0 and 100 % (Abd-El-Ghany & Abd-El-Ghany, 2017; Kienlen, Gertz, Briard, Hommay, & Chaufaux, 1996; Osman & Mohamed, 1991; Zurbrugg & Nentwig, 2009).

For each isolate, at each of the four concentrations, 20 *M. gagates* individuals (10 to determine the toxic effect and 10 as controls), each weighing approximately 800 mg, were placed individually in polystyrene containers with perforated lids covered with mesh cloth. Each box contained 20 g of sterile moist soil and 4 g of lettuce, impregnated with 4 mL of suspension of the lyophilisate or 4 mL of water for the control. Mortality was recorded every 12 hours for seven days and a Probit regression was performed (Finney, 1971) using the IBM SPSS version 23 statistical package (2014) to determine the dose that would produce 50 (LD50) and 99 % (LD99) mortality.

## Results and discussion

PCR and gene sequencing are effective tools for identifying and finding new Cry genes in *B. thuringiensis* that could be used as potential biopesticides (Vázquez-Ramírez, Rangel-Núñez, Ibarra, & del Rincón-Castro, 2015). Therefore, the determination of Cry1 genes in the isolates and the *B. thuringiensis* control was carried out using the specific primers Un1(f) and Un1(r) (Djenane et al., 2017; Gorashi, Tripathi, Kalia, & Gujar, 2014; Salama, Abd-El-Ghany, & Saker, 2015; Zothansanga, Kumar, & Gurusubramanian, 2011), and the expected product was observed in five isolates (Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 and Bt42) and in the commercial strain *B. thuringiensis* var *Kurstaki* (Figure 1). The difference in the concentration of the amplified product is probably due to the amount of template used in the PCR or to the

medio T3 (Khodabandeh et al., 2014) y se colocaron en agitación durante 10 días a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Posteriormente, el cultivo se centrifugó a  $3,500 \text{ g}$  durante 15 min y se realizaron tres lavados consecutivos con NaCl a  $1.5 \text{ M}$ , eliminándose el sobrenadante en cada oportunidad. El precipitado final se congeló y liofilizó. Para llevar a cabo los bioensayos, el liofilizado se resuspendió en agua destilada estéril hasta alcanzar una concentración de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  (Carmona, 2002).

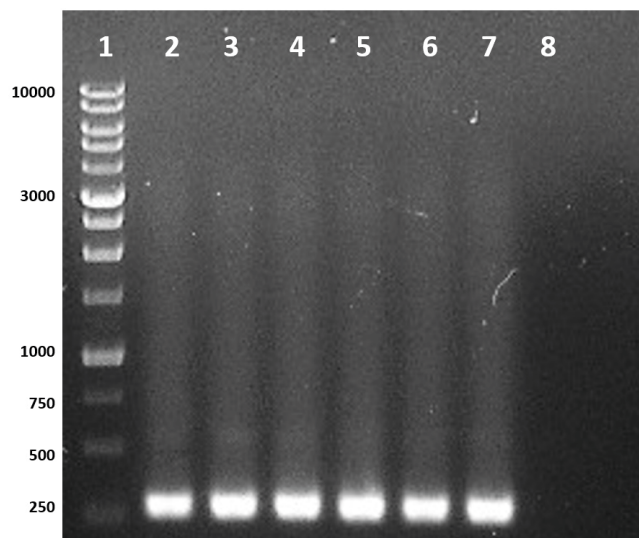
**Ensayo de toxicidad.** Existen reportes con diferentes concentraciones de producto a partir de aislados de *B. thuringiensis* con genes Cry1, en donde los rangos más utilizados son de 2 a  $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  y de 0.5 a  $2,000 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$  de complejo spora-cristal (Galvis-Serrano, 2013; Ibarra et al., 2003; Monnerat et al., 2007; Peña et al., 2006; Pitre, Hernández-Fernández, & Bernal, 2008; Schünemann, Knaak, & Fiuza, 2014). De acuerdo con la información anterior, en este trabajo se probaron cuatro concentraciones de liofilizado de *B. thuringiensis* (125, 250, 375 y  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) para evaluar su efecto tóxico sobre *M. gagates*. Se realizaron dos bioensayos en tiempos diferentes para cada aislado y control.

No se encontraron datos publicados que evidencien el efecto tóxico de *B. thuringiensis* en *M. gagates*; sin embargo, existen trabajos sobre la toxicidad de *B. thuringiensis* sobre otras especies de babosas y en caracoles empleando preparaciones comerciales en concentraciones de  $0.2$  a  $2 \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  con letalidad de entre 0 y 100 % (Abd-El-Ghany & Abd-El-Ghany, 2017; Kienlen, Gertz, Briard, Hommay, & Chaufaux, 1996; Osman & Mohamed, 1991; Zurbrugg & Nentwig, 2009).

Para cada aislado, en cada una de las cuatro concentraciones, se utilizaron 20 individuos de *M. gagates* (10 para determinar el efecto tóxico y 10 como testigos), cada uno con peso aproximado de 800 mg, colocados de manera individual en recipientes de poliestireno con tapas perforadas cubiertas con tela de malla. Cada caja contenía 20 g de tierra húmeda estéril y 4 g de lechuga, impregnada con 4 mL de suspensión del liofilizado o 4 mL de agua para el testigo. Se registró la mortalidad cada 12 horas durante siete días y se realizó una regresión Probit (Finney, 1971) con ayuda del paquete estadístico IBM SPSS versión 23 (2014) para determinar la dosis que produjera 50 (CL50) y 99 % (CL99) de mortalidad.

## Resultados y discusión

La PCR y la secuenciación de genes son herramientas eficaces para la identificación y el hallazgo de nuevos genes Cry en *B. thuringiensis* que podrían ser utilizados como potenciales biopesticidas (Vázquez-Ramírez, Rangel-Núñez, Ibarra, & del Rincón-Castro, 2015). Por lo anterior, se realizó la determinación de genes Cry1 en los aislados y el control *B. thuringiensis* utilizando



**Figure 1. Identification of the Cry1 gene in *Bacillus thuringiensis* with primers Un1(f) and Un1(r).** Line 1: molecular weight marker 1Kb DNA Ladder RTU (range between 250 to 10,000 bp); line 2-6: isolates Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 and Bt42 of *B. thuringiensis* where the expected DNA fragment is observed between 274 to 277 bp; line 7: control *B. thuringiensis* var. Kurstaki; line 8: negative control.

**Figura 1. Identificación del gen Cry1 en *Bacillus thuringiensis* con los cebadores Un1(f) y Un1(r).** Línea 1: marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder RTU (rango entre 250 a 10,000 pb); línea 2-6: aislados Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 y Bt42 de *B. thuringiensis* donde se observa el fragmento esperado de ADN entre 274 a 277 pb.; línea 7: control *B. thuringiensis* var. Kurstaki; línea 8: control negativo.

number of copies of Cry1 genes present in the bacteria, since the primers used generate different fragments with a size between 274 to 277 bp.

The buccal apparatus of *M. gagates* has well-developed jaws that allow it to destroy large amounts of plant material. They feed on all kinds of crops, such as corn, wheat, soybean, sunflower, lettuce, cabbage and celery. During the day they remain hidden underground protecting themselves from drying out and at night they go out in search of food, moving up to 5 m and managing to consume up to 50 % of their live weight (Serre, 2005). For this reason, in the establishment of the *M. gagates* hatchery, a daily intake of 400 mg per individual was expected; however, an average consumption of 250 mg of lettuce per day was obtained. This could be because they were not in their natural habitat and the characteristics of the hatchery did not fully recreate the temperature, moisture and light required for the development of *M. gagates*, which shows its maximum activity at night under high moisture concentrations (Córdoba-Vargas & León-Sicard, 2010).

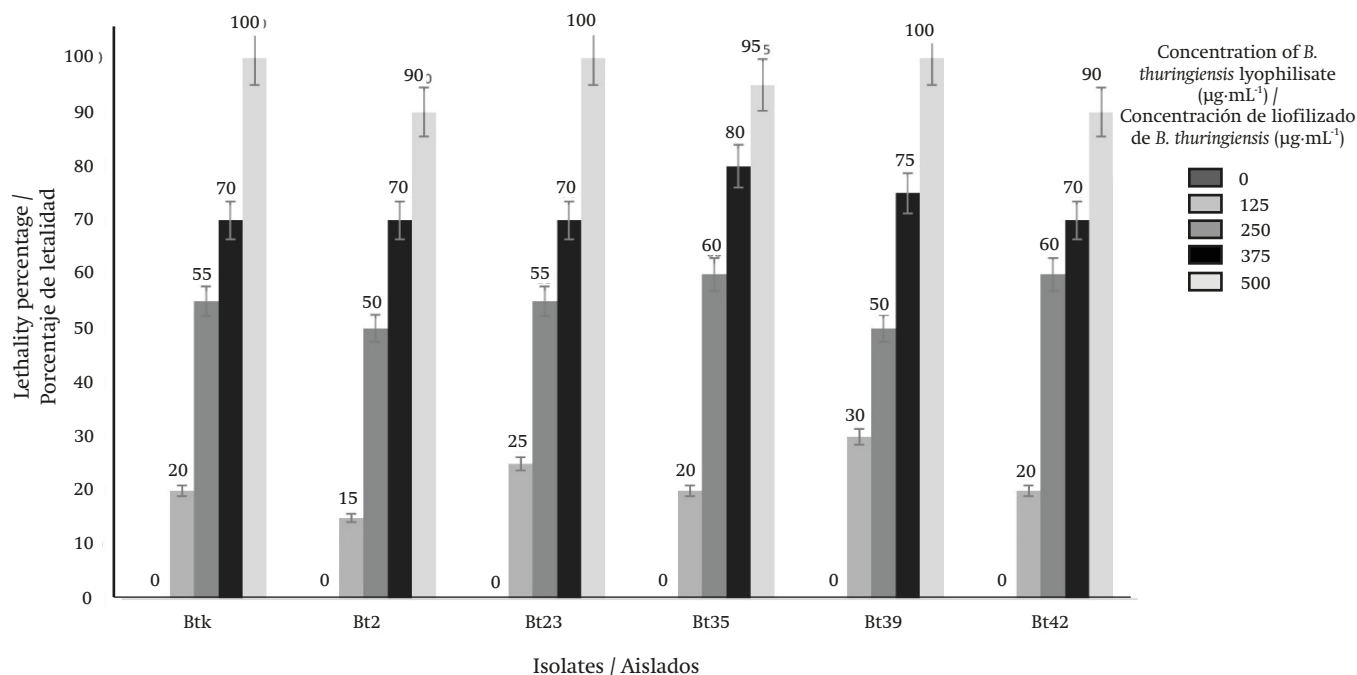
los cebadores específicos Un1(f) y Un1(r) (Djenane et al., 2017; Gorashi, Tripathi, Kalia, & Gujar, 2014; Salama, Abd-El-Ghany, & Saker, 2015; Zothansanga, Kumar, & Gurusubramanian, 2011), y se observó el producto esperado en cinco aislados (Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 y Bt42) y en la cepa comercial *B. thuringiensis* var. Kurstaki (Figura 1). La diferencia en la concentración del producto amplificado se debe, probablemente, a la cantidad de molde utilizado en la PCR o al número de copias de genes Cry1 presentes en las bacterias, ya que los cebadores empleados generan distintos fragmentos con un tamaño entre 274 a 277 pb.

El aparato bucal de *M. gagates* posee mandíbulas bien desarrolladas que le permite destruir grandes cantidades de materia vegetal. Se alimentan de toda clase de cultivos, tales como maíz, trigo, soya, girasol, lechuga, col y apio. Durante el día permanecen ocultas bajo tierra protegiéndose de la desecación y por la noche salen en busca de alimento, desplazándose hasta 5 m y logran consumir hasta 50 % de su peso vivo (Serre, 2005). Por ello, en el establecimiento del criadero de *M. gagates* se esperaba por individuo un consumo diario de 400 mg; sin embargo, se obtuvo un consumo promedio de lechuga al día de 250 mg. Lo anterior pudo deberse a que no se encontraban en su hábitat natural y las características del criadero no recrearon totalmente las condiciones de temperatura, humedad y luz requeridas para el desarrollo de *M. gagates*, quién presenta su máxima actividad durante la noche bajo concentraciones altas de humedad (Córdoba-Vargas & León-Sicard, 2010).

En el bioensayo, utilizando la concentración de 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , los aislados Bt23 y Bt39, y el control *B. thuringiensis* var. Kurstaki presentaron 100 % de letalidad en *M. gagates* con una exposición de cinco a siete días. Con el resto de las concentraciones, los resultados de letalidad observados fueron: con 375  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 70 a 80 %, con 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 50 a 60 % y con 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de 15 a 30 % (Figura 2). Todos los registros se tomaron a los siete días de exposición de *M. gagates* a la toxina. La muerte se evidenció por el ennegrecimiento de la parte inferior del abdomen y encorvamiento de la babosa (Figura 3). No se observó mortalidad en los controles negativos empleados.

El análisis con Probit permitió establecer la CL50 y CL99 de los aislados y control en 310 y 820  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectivamente (Cuadro 1). No se observaron diferencias significativas entre los aislados y el control positivo en cada concentración utilizada. Lo anterior sugiere la posible relación entre el efecto molusquicida y la presencia de genes Cry1 en los aislados de *B. thuringiensis* y control *B. thuringiensis* var. Kurstaki.

Las estrategias de control eficiente son necesarias si se tiene en cuenta que las babosas causan daño al follaje y a las raíces de las plantas de lechuga, ya que



**Figure 2. Lethality results of the isolates (Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 and Bt42) and the control *B. thuringiensis* (Btk) at different concentrations on *M. gagates* after seven days of exposure.**

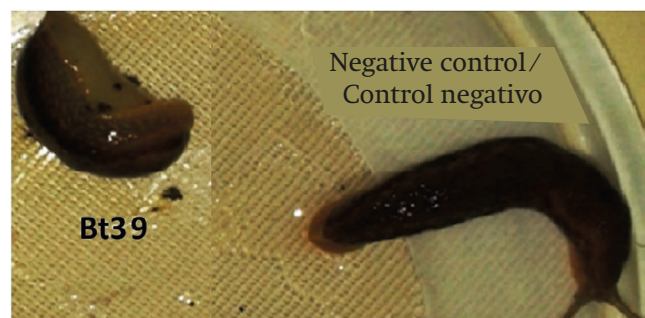
**Figura 2. Resultados de letalidad de los aislados (Bt2, Bt23, Bt35, Bt39 y Bt42) y el control *B. thuringiensis* (Btk) a diferentes concentraciones sobre *M. gagates* después de siete días de exposición.**

In the bioassay, using the 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  concentration, the isolates Bt23 and Bt39 and the control *B. thuringiensis* var. *Kurstaki* presented 100 % lethality in *M. gagates* with an exposure of five to seven days. With the rest of the concentrations, the observed lethality results were: with 375  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  from 70 to 80 %, with 250  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  from 50 to 60 % and with 125  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  from 15 to 30 % (Figure 2). All records were taken seven days after exposure of *M. gagates* to the toxin. Death was evidenced by the blackening of the lower abdomen and the bending of the slug (Figure 3). No mortality was observed in the negative controls used.

The Probit analysis allowed establishing the LD50 and LD99 of the isolates and control at 310 and 820  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , respectively (Table 1). No significant differences were observed between the isolates and the positive control at each concentration used. This suggests the possible relationship between the molluscicidal effect and the presence of Cry1 genes in the isolates of *B. thuringiensis* and the control *B. thuringiensis* var. *Kurstaki*.

Efficient control strategies are necessary if one considers that slugs cause damage to the foliage and roots of lettuce plants as high soil moisture, high organic matter content, low brightness and high planting density favor their populations and cause crop losses of up to 100 % (France, Gerding, Céspedes, & Cortez, 2002). Chemical management of this pest uses toxic baits composed of a food attractant and an active ingredient (carbamates

la alta humedad del suelo, el alto contenido de materia orgánica, la baja luminosidad y la alta densidad de siembra favorecen sus poblaciones y ocasionan pérdidas de hasta 100 % del cultivo (France, Gerding, Céspedes, & Cortez, 2002). El manejo químico de esta plaga emplea cebos tóxicos compuestos por un atrayente alimenticio y un ingrediente activo (carbamatos o metaldehidos), los cuales son rápidos y efectivos en el control de babosas. Godan (1983) reportó que el género *Milax* sp. puede presentar resistencia a los moluscicidas. Adicionalmente, el uso de estos químicos puede resultar tóxico para otros organismos como mamíferos, aves, peces e insectos (France et al., 2002). En mamíferos se sabe que la ingesta de metaldehído puede causar



**Figure 3. Toxic effect of *B. thuringiensis* on *M. gagates* at five days of exposure using 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of lyophilizate from isolate Bt39.**

**Figura 3. Efecto tóxico de *B. thuringiensis* sobre *M. gagates* a los cinco días de exposición empleando 500  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de liofilizado del aislado Bt39.**

**Table 1. Probit analysis to determine the LD50 and LD99 of the results obtained in the bioassays using isolates and the control *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki on *M. gagates*.**

**Cuadro 1. Análisis Probit para determinar la CL50 y CL99 de los resultados obtenidos en los bioensayos utilizando aislados y el control *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki sobre *M. gagates*.**

<i>B. thuringiensis</i> (Bt)	95 % confidence limits for concentration / Límites de confianza al 95 % para concentración					
	LD50/CL50			LD99/CL99		
	Estimate ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )/ Estimación ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Lower limit/ Límite inferior	Upper limit/ Límite superior	Estimate ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )/ Estimación ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )	Lower limit/ Límite inferior	Upper limit/ Límite superior
Bt var. Kurstaki	260	200	320	690	550	1040
Bt2	310	240	370	820	650	1260
Bt23	280	210	340	740	580	1090
Bt35	260	200	320	710	560	1050
Bt39	270	200	330	730	580	1070
Bt42	290	220	350	780	620	1170

or metaldehydes), which are fast and effective in the control of slugs. Godan (1983) reported that the genus *Milax* sp. can present resistance to molluscicides. Additionally, the use of these chemicals can be toxic to other organisms such as mammals, birds, fish and insects (France et al., 2002). In mammals, it is known that the intake of metaldehyde can cause depression of the central nervous system and, depending on the amount ingested, death (Córdoba-Vargas & León-Sicard, 2010). Consequently, control methods less harmful to the environment are required, such as the use of natural enemies of slugs (insects and nematodes) and the study of traditional biopreparates such as *B. thuringiensis*.

Gao et al. (2008) report pesticidal activity against the snail (*Oncomelania hupensis*) of a *B. thuringiensis* isolate, containing the Cry1A and Cry1C genes, with a lethality percentage above 90 %. The Cry1 genes are the most common in nature, being the most abundant in various molecularly characterized strains of *B. thuringiensis* (Arrieta, Hernández, & Espinoza, 2004; Gao et al., 2008; Jain, Sunda, Sanadhya, Nath, & Khandelwal, 2017). Van Frankenhuyzen (2013) reports the activity of Cry1 proteins across different orders and found toxicity in *Lepidoptera*, *Coleptera* and *Diptera*; in this review, the activity across classes and phyla of Cry proteins is also presented. This could explain the toxic effect observed in this study, where the *B. thuringiensis* isolates and the positive control with Cry1 genes showed over 90 % mortality against *M. gagates*, at a concentration of  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  of lyophilisate from the sporulated culture. The LD99 calculated in this study suggests the use of

depresión del sistema nervioso central y, dependiendo de la cantidad ingerida, puede provocar la muerte (Córdoba-Vargas & León-Sicard, 2010). En consecuencia, se requieren métodos de control menos perjudiciales al ambiente, como el uso de enemigos naturales de las babosas (insectos y nematodos) y el estudio de biopreparados tradicionales como *B. thuringiensis*.

Gao et al. (2008) reportan actividad pesticida contra el caracol (*Oncomelania hupensis*) de un aislado de *B. thuringiensis*, que contenía los genes Cry1A y Cry1C, con porcentaje de letalidad superior a 90 %. Los genes Cry1 son los más comunes en la naturaleza, siendo los más abundantes en diversas cepas de *B. thuringiensis* caracterizadas molecularmente (Arrieta, Hernández, & Espinoza, 2004; Gao et al., 2008; Jain, Sunda, Sanadhya, Nath, & Khandelwal, 2017). Van Frankenhuyzen (2013) reportó la actividad de las proteínas Cry1 entre diferentes órdenes y encontró toxicidad en *Lepidoptera*, *Coleptera* y *Diptera*; en esta revisión también se plantea la actividad entre clases y filos de las proteínas Cry. Lo anterior podría explicar el efecto tóxico observado en este trabajo, donde los aislados de *B. thuringiensis* y el control positivo con genes Cry1 mostraron más de 90 % de mortalidad contra *M. gagates*, a una concentración de  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  de liofilizado del cultivo esporulado. La CL99, calculada en este estudio, sugiere el uso de  $820 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para alcanzar 100 % de letalidad con cualquiera de los aislados experimentados.

En campo, se espera mayor voracidad de las babosas en el cultivo de la lechuga por encontrarse en su hábitat



820 µg·mL<sup>-1</sup> to achieve 100 % lethality with any of the isolates tested.

In the field, greater slug voracity in the lettuce crop is expected since they are in their natural habitat; however, with a correct formulation and dose of the biopreparate, an effective biological control of this pest would be expected.

## Conclusions

This study allows us to conclude that *B. thuringiensis*, by presenting Cry1 genes, not only has an insecticidal effect, but also causes lethality in gastropods such as *M. gagates*, thus offering a biological alternative, harmless to humans, for the control of this type of pest that considerably affects lettuce crops.

### End of English version

## References / Referencias

- Abd-El-Ghany, A. M., & Abd-El-Ghany, N. M. (2017). Molluscicidal activity of *Bacillus thuringiensis* strains against *Biomphalaria alexandrina* snails. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, 6(4), 1-3. doi: 10.1016/j.bjbas.2017.05.003
- Arrieta, G., Hernández, A., & Espinoza, A. M. (2004). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains isolated from coffee plantations infested with the coffee berry borer *Hypothenemus hampei*. *Revista de Biología Tropical*, 52(3), 757-764. Retrieved from [http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442004000300036&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442004000300036&script=sci_arttext)
- Bravo, A., Pacheco, S., Gómez, I., García-Gómez, B., Onofre, J., & Soberón, M. (2017). Insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis* and their mechanism of action. In: Fiuza, L., Polanczyk, R., & Crickmore, N. (Eds), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus* (pp. 53-66). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-56678-8\_4
- Carmona, A. (2002). Aislamiento y caracterización parcial de una cepa de *Bacillus thuringiensis* tóxica a *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Bioagro*, 14(1), 3-10. Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/857/85714101.pdf>
- Córdoba-Vargas, C. A., & León-Sicard, T. (2010). Efecto del manejo agroecológico y convencional sobre la fluctuación de babosa en cultivos de lechuga en Tenjo Cundinamarca. *Acta Biológica Colombiana*, 15(1), 115. doi: 10.15446/abc
- Crickmore, N. (2017). *Bacillus thuringiensis* toxin classification. In: Fiuza, L., Polanczyk, R., & Crickmore, N. (Eds), *Bacillus thuringiensis and Lysinibacillus sphaericus* (pp. 41-52). Cham, Switzerland: Springer International Publishing. doi: 10.1007/978-3-319-56678-8\_3
- Crickmore, N., Bone, E. J., Williams, J. A., & Ellar, D. J. (1995). Contribution of the individual components of the δ-endotoxin crystal to the mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *FEMS Microbiology Letters*, 131(3), 249-254. doi: 10.1111/j.1574-6968.1995.tb07784.x
- Djenane, Z., Nateche, F., Amziane, M., Gomis-Cebolla, J., El-Aichar, F., Khorf, H., & Ferré, J. (2017). Assessment of the antimicrobial activity and the entomocidal potential of *Bacillus thuringiensis* isolates from Algeria. *Toxins*, 9(4), 139-158. doi: 10.3390/toxins9040139
- Finney, D. J. (1971). *Probit Analysis* (pp. 68-72). Cambridge: Cambridge University Press.
- Food and Agriculture Organization Corporate Statistical Database (FAOSTAT). (2014). *FAO statistics division 2014*. Retrieved from <http://faostat.fao.org/>
- France, A., Gerding, M., Céspedes, C., & Cortez, M. (2002). Control de babosas (*Deroceras reticulatum* Müller) con *Phasmarhabditis hermaphrodita* Schneider (Nematoda: Rhabditidae) en suelos con sistema de cero labranza. *Agricultura Técnica*, 62(2), 181-190. doi: 10.4067/S0365-28072002000200001
- Galvis-Serrano, F. (2013). Caracterización molecular de genes *cry1*, *cry2*, *cry3* y *cry4* en aislados de *Bacillus thuringiensis* y determinación de su actividad bioinsecticida en larvas de *Aedes aegypti*. *Interciencia*, 38(2), 128-131. Retrieved from <http://www.redalyc.org/html/339/33926950004/>
- Gao, M., Li, R., Dai, S., Wu, Y., & Yi, D. (2008). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from soil in China and their pesticidal activities. *Biological Control*, 44(3), 380-388. doi: 10.1016/j.biocontrol.2007.11.011
- Garavano, M. E., Manetti, P. L., López, A. N., Clemente, N. L., Salvio, C., & Faberi, A. J. (2013). Cebos molusquicidas y molusquicidas líquidos para el control de *Deroceras reticulatum* (Pulmonata: Stylomatophora), plaga en el cultivo de colza. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 39(1), 60-66. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=86426063006>
- Godan, D. (1983). *Pest slugs and snails. Biology and control* (pp. 127-132). Berlin: Springer-Verlag.
- Gorashi, N. E., Tripathi, M., Kalia, V., & Gujar, G. T. (2014). Identification and characterization of the Sudanese *Bacillus thuringiensis* and related bacterial strains for their efficacy against *Helicoverpa armigera* and *Tribolium*

### Fin de la versión en español

- castaneum*. *Indian Journal of Experimental Biology*, 52(6), 637-649. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/90b8/534a663e65b296ad19ff9885e7bb57839406.pdf>
- Hung, T. P., Truong, L. V., Binh, N. D., Frutos, R., Quiquampoix, H., & Staunton, S. (2016). Fate of insecticidal *Bacillus thuringiensis* Cry protein in soil: differences between purified toxin and biopesticide formulation. *Pest Management Science*, 72(12), 2247-2253. doi: 10.1002/ps.4262
- Ibarra, J. E., del Rincón, M. C., Ordúz, S., Noriega, D., Benintende, G., Monnerat, R., & Sánchez, J. (2003). Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5269-5274. doi: 10.1128/AEM.69.9.5269-5274.2003
- IBM SPSS. (2014). *Statistics for Windows ver. 23*. Retrieved from <https://www.ibm.com/us-en/>
- Jain, D., Sunda, S. D., Sanadhya, S., Nath, D. J., & Khandelwal, S. K. (2017). Molecular characterization and PCR-based screening of cry genes from *Bacillus thuringiensis* strains. *Biotech*, 7(4), 1-8. doi: 10.1007/s13205-016-0583-7
- Khodabandeh, F., Safaralizadeh, M. H., Safavi, S. A., & Aramideh, S. (2014). Virulence of some native *Bacillus thuringiensis* isolates against *Ephestia kuehniella* (Zeller) (Lep., Pyralidae) and *Pieris brassicae* (Lep., Pieridae) larvae isolated from stored products of Urmia city. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 47(5), 610-614. doi: 10.1080/03235408.2013.816101
- Kienlen, J. C., Gertz, C., Briard, P., Hommay, G., & Chaufaux, J. (1996). Recherche de la toxicité de diverses souches de *Bacillus thuringiensis* Berliner vis-à-vis de trois espèces de limaces. *Agronomie*, 16(6), 347-353. doi: 10.1051/agro:19960602
- Monnerat, R. G., Batista, A. C., de Medeiros, P. T., Martins, E. S., Melatti, V. M., Praça, L. B., & Falcao, R. (2007). Screening of Brazilian *Bacillus thuringiensis* isolates active against *Spodoptera frugiperda*, *Plutella xylostella* and *Anticarsia gemmatilis*. *Biological Control*, 41(3), 291-295. doi: 10.1016/j.biocontrol.2006.11.008
- Neira, O., Muñoz, S., Stanley, V., Gosh, C., & Rosales, L. (2010). *Cryptosporidium parvum* in wild gastropods as bioindicators of fecal contamination in terrestrial ecosystems. *Revista Chilena de Infectología*, 27(3), 211-218. doi: S0716-10182010000300006
- Osman, G. Y., & Mohamed, A. M. (1991). Bio-efficacy of bacterial insecticide, *Bacillus thuringiensis* Berl. as biological control agent against snails vectors of Schistosomiasis in Egypt. *Anzeiger für Schädlingskunde*, 64(7), 136-139. doi: 10.1007/BF01906005
- Peña, G., Miranda-Rios, J., de la Riva, G., Pardo-López, L., Soberón, M., & Bravo, A. (2006). A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 353-360. doi: 10.1128/AEM.72.1.353-360.2006
- Pitre, L., Hernández-Fernández, J., & Bernal, J. (2008). Toxicidad de  $\delta$ -endotoxinas recombinantes de *Bacillus thuringiensis* sobre larvas de la polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 85-96.
- Rojas-Arias, A. C., López-Pazos, S. A., & Chaparro-Giraldo, A. (2013). Actividad biológica de *Bacillus thuringiensis* sobre la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora* Povolny (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Mutis*, 3(2), 31-42. doi: 10.21789/22561498.883
- Salama, H. S., Abd-El-Ghany, N. A., & Saker, M. M. (2015). Diversity of *Bacillus thuringiensis* isolates from Egyptian soils as shown by molecular characterization. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 13(2), 101-109. doi: 10.1016/j.jgeb.2015.10.001
- Schünemann, R., Knaak, N., & Fiuza, L. M. (2014). Mode of action and specificity of *Bacillus thuringiensis* toxins in the control of caterpillars and stink bugs in soybean culture. *ISRN Microbiology*, 2014, 1-13. doi: 10.1155/2014/135675
- Serre, M. (2005). *Manejo de babosas en el cultivo de girasol en siembra directa*. Argentina: Pioneer Argentina. Retrieved from [http://www.pioneer.com/CMRoot/International/Argentina\\_Intl/AGRONOMIA/con\\_agric\\_inv\\_lotes/IL\\_Manjobabosa\\_girasol\\_05.pdf](http://www.pioneer.com/CMRoot/International/Argentina_Intl/AGRONOMIA/con_agric_inv_lotes/IL_Manjobabosa_girasol_05.pdf)
- Van Frankenhuyzen, K. (2013). Cross-order and cross-phylum activity of *Bacillus thuringiensis* pesticidal proteins. *Journal of Invertebrate Pathology*, 114(1), 76-85. doi: 10.1016/j.jip.2013.05.010
- Vargas-Arcila, M., Cartagena-Valenzuela, J. R., Franco, G., Correa-Londoño, G. A., Quintero-Vásquez, L. M., & Gaviria-Montoya, C. A. (2017). Changes in the physico-chemical properties of four lettuce (*Lactuca sativa* L.) varieties during storage. *Corpoica Cienc Tecnol Agropecuaria*, 18(2), 257-273. doi: 0.21930/rcta.vol18\_num2\_art:632257-273
- Vázquez-Ramírez, M. F., Rangel-Núñez, J. C., Ibarra, J. E., & del Rincón-Castro, M. C. (2015). Evaluación como agentes de control biológico y caracterización de cepas mexicanas de *Bacillus thuringiensis* contra el gusano cogollero del maíz *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae). *Interciencia*, 40(6). Retrieved from <http://www.redalyc.org/pdf/339/33938675006.pdf>
- Zothansanga, L., Kumar, N. S., & Gurusubramanian, G. (2011). PCR pathotyping of native *Bacillus thuringiensis* from Mizoram, India. *Science Vision*, 11(3), 171-176. Retrieved from <https://pdfs.semanticscholar.org/0b59/466b7c801f3abc8308c34f4f39e9b7130eba.pdf>
- Zurbrugg, C., & Nentwig, W. (2009). Ingestion and excretion of two transgenic Bt corn varieties by slugs. *Transgenic Research*, 18(2), 215-225. doi: 10.1007/s11248-008-9208-1