



Universidad
de La Laguna



*Facultad de ciencias.
Sección de Biología*

A stylized, grey-toned illustration of a building facade with three arches at the base and a central tower. The title 'Bioinsecticidas' is overlaid on the upper part of the building, and 'Bioinsecticides' is overlaid on the lower part.

Bioinsecticidas

Bioinsecticides

Trabajo de Fin de Grado

Virginia Padilla Martin

Tutorizado por Ángel M. Gutiérrez Navarro. Grado en Biología. Marzo

2017

SOLICITUD DE DEFENSA Y EVALUACIÓN TRABAJO FIN DE GRADO Curso Académico: 2016/2017	ENTRADA Fecha: Núm:
--	----------------------------------

Datos Personales


Nº DNI o pasaporte: 43833289G	Nombre y Apellidos: Virginia Padilla Martin
Teléfono: 648765764	Dirección de correo electrónico: virgi_pm_93@hotmail.com

SOLICITA la defensa y evaluación del Trabajo Fin de Grado

TÍTULO

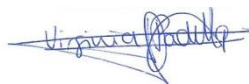
Bioinsecticidas

Autorización para su depósito, defensa y evaluación

D./Dña. Ángel M. Gutiérrez Navarro	
Profesor/a del Departamento de Bioquímica, Microbiología, Biología Celular y Genética.	
y D./Dña.	
Profesor/a del Departamento de	
autorizan al solicitante a presentar la Memoria del Trabajo Fin de Grado	
Fdo.: 	Fdo.:

La Laguna, a 2 de Marzo de 2017

Firma del interesado/a



SR/A. PRESIDENTE DE LA COMISIÓN DE GRADO DE LA FACULTAD DE BIOLÓGÍA

Documentación a adjuntar:

- Un ejemplar en formato electrónico de la Memoria conforme a las normas de presentación establecidas en el Anexo I del Reglamento para la elaboración y defensa del TFG.
- Informe-evaluación de los tutores en sobre cerrado y firmado.

ÍNDICE

Resumen.....	3
Abstract	3
Introducción	4
Los baculovirus como agentes del control microbiano de insectos.....	7
Hongos entomopatógenos: Quitinasas y proteasas como factores de virulencia	8
Nemátodos	11
Protozoos.....	12
Bacterias entomopatógenas utilizadas en el control de plagas. <i>Bacillus thuringiensis</i> . 12	
Conclusión	18
Conclusion	18
Referencias bibliográficas	19

Resumen

Las bacterias, hongos, insectos y virus son los causantes de la mayor parte de los problemas fitosanitarios, provocando una disminución de la calidad de los productos de interés hasta la pérdida de las cosechas. La solución a estos problemas se ha ejercido con la utilización de compuestos químicos que no sólo son de toxicidad no selectiva sino que, además, pueden tener consecuencias como la contaminación ambiental y la aparición de organismos resistentes. Por eso en los últimos años se han investigado métodos alternativos para el control de plagas y enfermedades donde destacan los procesos de biocontrol. Los bioinsecticidas se utilizan para designar a muchos agentes de control de plagas como microorganismos (virus, bacterias, hongos), nemátodos entomófagos, pesticidas de origen vegetal, feromonas, genes... La ventaja de estos bioplaguicidas frente a los químicos es que no son dañinos y provocan una menor carga ambiental, además de que atacan a una única plaga o a la especie diana. Entre los principales bioplaguicidas destaca *B. thuringiensis* siendo uno de los métodos más baratos y efectivos. La característica principal de esta bacteria es que durante el proceso de esporulación se produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica. Estas proteínas se llaman cry (crystal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido en todo el mundo.

Palabras clave: biopesticidas, plagas, *B. thuringiensis*, proteínas cry.

Abstract

Bacteria, fungi, insects and viruses cause most of the phytosanitary problems, being responsible of a decrease in the quality of the products of interest until the loss of crops. The solution to these problems has been exercised using chemical compounds of non-selective toxicity which, in addition, can lead to adverse consequences such as environmental pollution and the appearance of resistant organisms. For this reason, in the last years, alternative methods have been investigated for the control of pests and diseases where biocontrol processes stand out. Bioinsecticides are used to designate many pest control agents as microorganisms (viruses, bacteria, fungi), entomophagus nematodes, plant-based pesticides, pheromones, genes ... The advantage over chemicals of these biopesticides is that they are not harmful and they cause a lower environmental load, as well as they attack single pest or the target species. Among the main biopesticides in pest control, *B. thuringiensis* is one of the cheaper and more effective methods. The main characteristic of this bacterium is that during the sporulation process a parasporal inclusion is formed constituted by one or more crystalline bodies of a protein nature. These proteins are called cry (crystal) and they are the basis of the most worldwide widespread biological insecticide.

Keywords: biopesticides, pests, *B. thuringiensis*, cry proteins.

Introducción

La mayor parte de los problemas fitosanitarios están causados por bacterias, hongos, insectos o virus que colonizan diferentes partes de la planta atacada provocando efectos diversos desde una disminución de la calidad de los productos de interés hasta la pérdida total de las cosechas. De ahí que sea del mayor interés el control de las plagas y las enfermedades de los vegetales, sobre todo de los de interés agrícola. Este control se ha ejercido clásicamente mediante la utilización de diversos compuestos químicos de toxicidad no selectiva, cuyo uso indiscriminado ha tenido como consecuencias graves problemas de contaminación ambiental y también la aparición y selección de organismos resistentes. Por ello, desde hace años se viene explorando la utilización de métodos alternativos para el control de plagas y enfermedades, entre los que destacan los llamados procesos de biocontrol.

Este fenómeno natural de regulación de plagas manejado por el hombre a través de la intensificación de la intervención de agentes de control biológico, plantas y herbívoros provisto de bases ecológicas se dio a conocer en la década de los 70 del siglo pasado como Manejo Integrado de Plagas (MIP) (van des Boshch et al, 1982). Posteriormente, tras su creación, la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) definió el control biológico como “la utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos”.

A este respecto, es necesario distinguir entre el control natural y el control biológico. El primero se refiere a la fluctuación que, durante un tiempo, experimenta la densidad de la población de un organismo entre unos límites superior e inferior debido a factores ambientales, tanto biótica como abiótica. El control biológico es consecuencia de la acción de enemigos naturales (parasitoides, depredadores y patógenos) en el mantenimiento de la densidad de otro organismo a un nivel más bajo del que se produciría en ausencia de ellos. Incluso en el control biológico podemos distinguir dos situaciones: el llamado control biológico natural, que es el que se produce sin intervención del hombre y el control biológico aplicado que consiste en la manipulación de los enemigos naturales de las plagas por parte del hombre para lograr su control. Y éste es el método de más perspectivas en agricultura a la vista de los problemas derivados del uso de productos químicos para el control.

El control biológico aplicado puede llevarse a cabo mediante métodos diversos, que, de forma esquemática, pueden ser divididos en dos grupos. Por un lado, existen los métodos de control macrobiológico (o lucha macrobiológica), basados en la utilización de entomófagos que pueden ser parasitoides (insectos parásitos que viven dentro o sobre otros insectos u otros artrópodos hospedadores a los que eventualmente les causan la muerte), o de predadores (animales que se alimentan sobre otros animales-presa que son más pequeñas y/o más débiles que ellos mismos).

Los otros métodos son los microbiológicos (también llamada lucha microbiológica), consistente en la utilización de microorganismos entomopatógenos que se desarrollan sobre el insecto plaga y le originan la expresión de una enfermedad que puede eventualmente provocar su muerte.

El control biológico cuando funciona posee muchas ventajas, entre las que se pueden destacar:

- Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos incluido el hombre.
- La resistencia de las plagas al control biológico es muy rara.
- El control biológico con frecuencia es a largo término pero permanente.
- El tratamiento con insecticidas es eliminado de forma sustancial.
- La relación coste/beneficio es muy favorable.
- Evita plagas secundarias.
- No existen problemas con intoxicaciones.

Ahora bien, también existen limitaciones para su empleo, entre las que se pueden citar:

1. Ignorancia sobre los principios del método.
2. Falta de apoyo económico.
3. Falta de personal especializado.
4. No está disponible en la gran mayoría de los casos.
5. Problemas con umbrales económicos bajos
6. Enemigos naturales más susceptibles a los plaguicidas que las plagas.

Los enemigos naturales se incrementan con retraso en comparación a las plagas que atacan, por lo cual no proveen una supresión inmediata.

La introducción de agentes de control biológico frecuentemente se declara por ser ambientalmente segura y sin riesgos; sin embargo, existen evidencias que indican que esta aseveración no es del todo cierta. La mayoría de los fracasos de control biológico se han debido a errores por la carencia de planificación y pobre evaluación de los enemigos naturales antes de una introducción. En algunos casos los errores han sido tan funestos que se ha provocado la extinción de otras especies.

En el futuro el uso de control biológico como parte del Manejo de plagas debe ir en ascenso debido al incremento en el número de plagas resistentes a los insecticidas, contaminación del medio ambiente y el incremento de las regulaciones que prohíben el uso de productos químicos. También los programas de control biológico clásico continúan siendo necesarios debido a que las plagas exóticas continúan expandiéndose por el mundo debido al auge del comercio y a que los enemigos naturales exóticos pudieran ser utilizados para el control de plagas nativas. En los países en desarrollo, donde es altamente elevado el costo de los insecticidas y muy frecuente la resistencia de las plagas a estos, el control biológico tiene una aplicación especial, pero no ha sido ampliamente explotado. Por lo tanto, el control biológico

constituye para América Latina el método de control de plagas más viable, ecológicamente recomendable y autosostenido.

Algunos de los más importantes problemas que actualmente tiene planteados la protección de los cultivos son consecuencia del uso indiscriminado y casi exclusivo que se ha venido haciendo de los insecticidas químicos de síntesis. El desarrollo de biotipos de insectos resistentes a estos insecticidas y la acumulación de residuos tóxicos en el suelo, en el agua y en los productos cosechados son algunos de los efectos más conocidos y los que provocan una mayor preocupación pública por la repercusión que esto pueda tener en la salud humana y en la calidad del medio ambiente. Urge, por tanto, la necesidad de desarrollar otras medidas de control de plagas que permitan el desarrollo de una agricultura sostenible y la conservación del medio ambiente. Una de las alternativas más prometedora y realista es el desarrollo de bioinsecticidas basados en los microorganismos (bacterias y hongos) y virus entomopatógenos.

El término bioinsecticida, también llamado biopesticida o bioplaguicida, se utiliza para designar a muchos agentes del control de plagas como.

- Microorganismos (virus, bacterias u hongos)
- Nematodos entomófagos
- Pesticidas de origen vegetal
- Metabolitos secundarios de microorganismos
- Feromonas de insectos que se utilizan para interrumpir el apareamiento o para combinarlas con productos insecticidas
- Genes incorporados a las plantas de interés agrícola para hacerlas resistentes a los ataques por insectos o tolerantes a los herbicidas.

Así pues, los bioplaguicidas más comúnmente utilizados son organismos vivos patógenos para la plaga en cuestión. El interés en ellos se basa en las ventajas que presentan frente a los plaguicidas convencionales: son menos dañinos y provocan una menor carga ambiental; por otra parte, atacan solamente a la plaga o a la especie diana; son eficaces en cantidades pequeñas descomponiéndose rápidamente; cuando se utilizan con componentes de los programas de manejo integrado de plagas (MIP) los bioinsecticidas contribuyen en gran medida.

En este trabajo se pretende presentar una breve descripción de las principales aplicaciones de los bioplaguicidas en el control de plagas producidas por insectos.

Los baculovirus como agentes del control microbiano de insectos

Se trata de virus que contienen ADN de doble cadena cuyo tamaño varía de 80-130 kb y poseen una partícula viral en forma de bastón. Los viriones se ocluyen en cuerpos de oclusión (CO's) que se conocen como poliedros (Tinsley, T.W. & D. C. Kelly. 1985). Los baculovirus se clasifican en dos géneros: los nucleopoliedrovirus (NPV) y granulovirus (GV). Los NPV se dividen a su vez en nucleopoliedrovirus simples (NPVS) que tienen una sola nucleocápsida por envoltura vírica y nucleopoliedrovirus múltiples (NPVM) que presentan más de una nucleocápsida en cada envoltura (Figura 1); ambos grupos se replican únicamente en el núcleo de las células infectadas; La especie tipo del primero de ellos es el virus de *Bombix mori* mientras que para los segundos es el NPVM de *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae) (AcNPV). Los granulovirus son baculovirus cuyos poliedros tienen forma granular, y poseen una única nucleocápsida por envoltura viral y un solo virión por gránulo. Son de menor tamaño que los NPV y la especie tipo es un GV aislado de la "palomilla de la manzana" *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae).

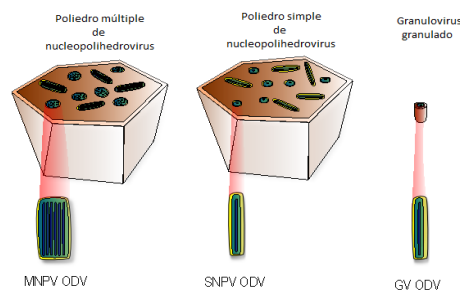


Figura 1. Esquema base de la morfología de lo CO's de los Nucleopolihedrovirus. CO's con nucleocápsida múltiple y nucleocápsida simple.

Existe un último grupo, el de los virus no ocluidos (VNO), cuya característica principal es que las nucleocápsidas no se encuentran ocluidas en una matriz de proteína y su replicación se ha observado en el núcleo de la célula hospedera. La especie tipo la constituye el VNO del "escarabajo de la palma", *Oryctes rhinoceros*. Se han publicado cerca de 600 aislamientos de baculovirus de diferentes insectos (Vlak, J. M. 1992) pero el ICTV solamente reconoce a 30 especies baculovirus.

En la sintomatología de las infecciones causadas por los baculovirus, las larvas afectadas no presentan síntomas durante los primeros días después de la infección. Posteriormente, se observa un cambio en el comportamiento del insecto, ya que sus movimientos son más lentos, deja de comer y el crecimiento se detiene (Granados, R. R. & K. A. Williams. 1986). También se observa un cambio de color del integumento y el reblandecimiento del mismo, el cual se torna blanquecino, se rompe, y se libera un fluido blanco-grisáceo, que contiene CO's en grandes concentraciones. Finalmente, la

larva muerta queda colgando de las propatas en una posición de V invertida, lo que favorece la dispersión del virus en el medio ambiente. (Figura 2)

Existen dos metodologías para producir baculovirus como bios insecticidas. Una de ellas es en individuos susceptibles (*in larva*), siendo el método más utilizado, aunque se trata de una labor intensiva puesto que requiere la manipulación de grandes cantidades de insectos vivos bajo condiciones de insectario. Lo que se hace es suministrar el virus a las larvas del hospedador mediante dietas artificiales contaminadas y se utilizan larvas entre el 3° y 4° estadio que son más sensibles a los y producen grandes cantidades de CO's (Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993). El otro método es la infección de células de insectos cultivadas *in vitro*.

Las formulaciones para baculovirus son polvos humectables que se pueden aplicar fácilmente en el campo. Sin embargo, tienen un modo de acción lento, por lo que se han ido desarrollando estrategias que permiten incrementar la virulencia para así aumentar su potencial como agentes de control biológico. Estas estrategias consisten en insertar genes en el genoma de los baculovirus que, al expresarse, producen algún factor como toxinas específicas contra insectos, enzimas hidrolíticas o reguladores del crecimiento que matan al insecto incluso antes de que se produzca la invasión masiva de los tejidos (Ibarra, J.E. et al, 2006).

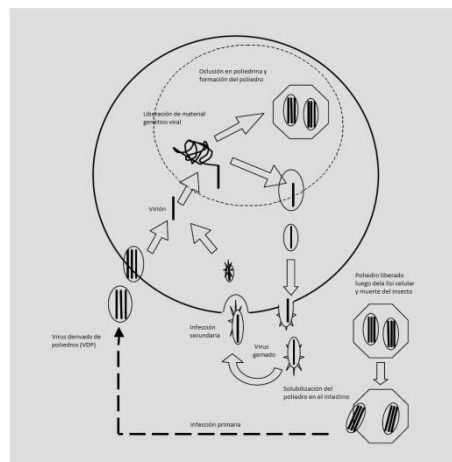


Figura 2. Ciclo de infección del virus de la poliedrosis nuclear (VNP). El poliedro es ingerido y solubilizado en el intestino medio del insecto. Los VDP son liberados y entran a la célula del huésped. Allí, los viriones al núcleo y se libera el material genético.

Hongos entomopatógenos: Quitinasas y proteasas como factores de virulencia

Otra alternativa en el control microbiológico de las plagas es la utilización de organismos entomopatógenos. Dentro de los agentes entomopatógenos se incluyen bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos fundamentalmente. Generalmente, se caracterizan por su escasa toxicidad sobre otros organismos del ambiente, por su

aptitud para ser tratados industrialmente, es decir, se cultivan, formulan, empaquetan, almacenan y se comercializan como un insecticida convencional. Estos insecticidas biológicos penetran en el insecto plaga por ingestión, y también, en el caso de los hongos, por contacto.

Los hongos entomopatógenos son importantes reguladores naturales de las poblaciones de insectos ya que prácticamente todos los insectos son sensibles a alguna enfermedad de etiología fúngica (Rodríguez, S.M. et al, 2006). Debido a ello, tienen un importante potencial como agentes micoinsecticidas contra diversas plagas de insectos en la agricultura.

Estos hongos infectan a los organismos penetrando a través de la cutícula, llegando a la hemolinfa, donde llevan a cabo la producción de toxinas y crecen mediante la utilización de los nutrientes presentes en la hemolinfa para evitar posibles respuestas inmunes por parte de los insectos.

De forma general, los hongos presentan las siguientes fases de desarrollo sobre los hospederos: germinación, formación de apresorios y estructuras de penetración, colonización y reproducción del patógeno. En todos los casos la unidad infectiva es la espora (reproducción sexual) o el conidio (reproducción asexual). El inicio de la infección se realiza por germinación de las esporas del hongo sobre el tegumento del individuo plaga, con la adherencia de la espora o el conidio a la cutícula del insecto. La dispersión de las esporas se realiza por contaminación ambiental a través del viento, la lluvia e incluso individuos enfermos al entraren contacto con otros sanos. Normalmente son especies específicas o de amplio espectro de hospedadores (insectos y ácaros). Los individuos enfermos no se alimentan, presentan debilidad y desorientación y cambian de color, presentando manchas oscuras sobre el tegumento, que se corresponden con las esporas germinadas del hongo (figura 3). Luego se produce un tubo germinativo y un apresorio con el que se fija a la cutícula y con el tubo germinativo o haustorio (hifa de penetración) se da la penetración al interior del cuerpo del insecto mediante una combinación de procesos físicos y químicos. El proceso físico consiste en la presión que ejerce la hifa, que va rompiendo las áreas esclerotizadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico, por su parte, consiste en la acción de enzimas, principalmente proteasas, lipasas y quitinasas que provocan la descomposición del tejido en la zona de penetración (Monzón, A. 2001). En el área de la procutícula alrededor de la penetración, aparecen síntomas de histólisis (descomposición del tejido por acción enzimática). A partir de la penetración se inicia el proceso de colonización, en el cual la hifa sufre un engrosamiento y se ramifica en la cavidad general del cuerpo. A partir de ese momento se forman pequeñas colonias del hongo y otros cuerpos hifales, sin embargo, no ocurre gran crecimiento hifal antes de la muerte del insecto.



Figura 3. Fotografía que muestra una larva sana (izquierda) y otra afectada por la infección por un hongo (derecha). Nótese la diferencia de color.

Después de la muerte del insecto, el hongo crece dentro del cadáver y todos los tejidos internos son penetrados por hifas filamentosas. La colonización de los diferentes órganos se produce en la siguiente secuencia: cuerpos grasos, sistema digestivo, tubos de Malpigi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráqueas. La muerte del insecto ocurre debido a la producción de micotoxinas, cambios patológicos en el hemocele, acción histolítica y bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas. Después de 48 a 60 horas de la muerte del insecto, las hifas comienzan a emerger por los espiráculos, ano y boca a través de las áreas más débiles (regiones intersegmentales).

Además de la producción de enzimas, los hongos entomopatógenos poseen la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedador. El estudio de estas toxinas es de suma importancia ya que se pueden sintetizar productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acariciada y nematicida. Es posible también seleccionar aislamientos de hongos altamente toxicogénicos que se encuentran en forma natural o bien ser mejoradas genéticamente con relación a ese aspecto (Roberts 1989).

Normalmente, los hongos, son entomopatógenos de acción lenta. Algunos atacan a gran cantidad de especies distintas de insectos. Pero estos productos dependen generalmente de las condiciones ambientales de temperatura (25° C) y de elevada humedad relativa para que su desarrollo y acción patógena sea la adecuada. Se suelen comercializar en preparados a base de esporas que deben estar en agua unas 24 horas antes de su aplicación. Generalmente, tardan una semana como mínimo en eliminar a la víctima o, al menos, en que ésta deje de alimentarse.

Un caso bien conocido de control de una plaga mediante la utilización de hongos entomopatógenos es del de la mosca blanca, *Bemisia tabaci*, que es considerada como una de las plagas de mayor importancia económica a nivel mundial, ya que ataca a cultivos como soja, tomate, algodón, cucurbitáceas y más de 500 especies de plantas ornamentales y malezas de climas cálidos (Osborne L. S. et al, 1990) (Figura 4). Esta plaga no es bien controlada con insecticidas, debido a una disminución de la

sensibilidad a los mismos. Una alternativa a esta problemática la representa el control biológico, dentro del cual se ha utilizado con éxito a los hongos entomopatógenos, entre los que destacan *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* (Figura 4) que son patógenos naturales y muy agresivos contra la mosca. Sin embargo, la patogenicidad está restringida por varios factores físicos y biológicos. Entre estos últimos se encuentran la capacidad de adhesión de la espora a la cutícula, la rapidez de germinación y crecimiento de la hifa, además de la capacidad para irrumpir y penetrar la cutícula del insecto mediante la acción conjunta de la presión mecánica y la degradación de componentes de la cutícula, mediante la acción de las enzimas segregadas por el hongo (Hajek, A. E. y R. J. St. Leger. 1994).

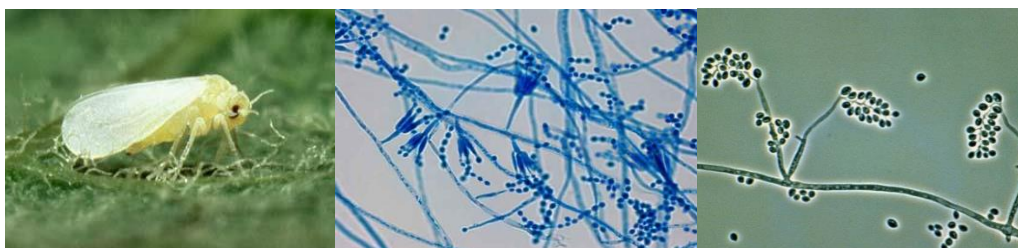


Figura 4. Fotografías que muestran a la plaga de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), y a los hongos *Paecilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana* respectivamente.

En la cutícula, la quitina constituye alrededor del 30% y las proteínas con casi el 40% se encuentran formando una barrera estructural que debe ser hidrolizada por quitinasas y proteasas para que las hifas alcancen y se dispersen el hemocele. Por lo tanto, estas exoenzimas juegan un papel importante en la hidrólisis de la cutícula del y su actividad se ha relacionado con la virulencia del hongo (Gupta S. C. et al, 1994) de forma que se han obtenido mutantes de ambos hongos con un incremento en la producción o en la actividad enzimática de proteasas y quitinasas que, paralelamente, tienen incrementada su acción patógena sobre la mosca blanca.

Se puede concluir que la utilización de hongos entomopatógenos para el control de insectos es una alternativa viable desde el punto de vista económico, ya que se pueden reproducir a gran escala y en pequeñas cantidades. Es necesario para llevar a cabo programas de control de insectos con hongos entomopatógenos, un buen conocimiento sobre selección de aislamientos y técnicas de bioensayo, para seleccionar razas patogénicas y virulentas adaptadas a condiciones ecológicas específicas.

Nemátodos

Los nemátodos atacan a distintos grupos de insectos, aunque precisan de un medio de cierta humedad para su infección activa y, por ello, normalmente actúan sobre insectos que tienen parte de su ciclo de vida en el suelo, donde la humedad es mayor. Se distinguen tres tipos de nematodos entomófagos. El primero está constituido por

los nemátodos más primitivos que son patógenos pero comedores de bacterias del grupo Rhabditoides; el nemátodo penetra en el insecto y segrega en él una bacteria a la que está asociado que se desarrolla en el interior del insecto y sirve de alimento para el nematodo que la liberó en su interior. Dentro de este grupo destacan los nemátodos de los géneros *Neoaplectana* y *Heterorhabditis*. El segundo grupo está formado por nemátodos evolucionados que son fitopatógenos y han evolucionado hacia formas patógenas de insectos. Emplean el estilete para penetrar en el insecto. Destacan los grupos Aphelenchida y Tylenchida. Por último, encontramos los nemátodos depredadores de insectos, que pertenecen al grupo Dorylaimida. Comercialmente destacan *Neoaplectana carpocapse*, que afecta a lepidópteros y coleópteros, y *Heterorhabditis* spp activo frente a lepidópteros (Gerling, D. 1986), (Viñuela, E. y J. Jacas. 1993), (Viñuela, E. 2000).

Protozoos

Existen protozoos patógenos de personas, plantas o insectos. No se emplean con frecuencia en el control de insectos debido a la falta de especificidad por parte de la mayoría de especies de protozoos. Los estados infecciosos del protozoo (esporas, quistes...) penetran en el tubo digestivo del insecto y lo colonizan hasta llegar al aparato excretor. La espora germina gracias al pH ácido del estómago, se forma el protozoo y produce nuevas esporas. Los insectos mueren por falta de asimilación de elementos nutritivos. El protozoo más comercializado es *Nosema locustae*, que afecta a ortópteros.

Bacterias entomopatógenas utilizadas en el control de plagas. *Bacillus thuringiensis*.

a) **Generalidades de *Bacillus thuringiensis***. Es probable que los biopesticidas bacterianos sean los métodos más baratos y más ampliamente utilizados para el control biológico de las plagas producidas por insectos. Estos pueden ser infectados por muchas especies bacterianas, pero las más ampliamente utilizadas como bioinsecticidas son las pertenecientes al género *Bacillus*. Una de ellas, *B. thuringiensis*, ha desarrollado muchos mecanismos moleculares para producir toxinas activas frente a insectos, la mayoría de las cuales están codificadas por un conjunto de genes diversos, denominados *cry* (Schnepf E. et al, 1998). *B. thuringiensis* es considerada una bacteria ubicua, ya que se ha aislado de todas partes del mundo y de muy diversos sistemas como suelo, agua, hojas de plantas, insectos muertos, telarañas, etc. Es un bacilo gram positivo, de flagelación peritrica, que mide de 3 a 5 μm de largo por 1 a 1,2 μm de ancho y que posee la característica de desarrollar endosporas elipsoidales no deformantes (Gordon R, W. Haynes y C. Pang. 1973). Es anaerobio facultativo, quimioorganotrofo y con actividad de catalasa (Sneath P. 1986). Los distintos

aislamientos de *B. thuringiensis* presentan en general características bioquímicas comunes. Poseen la capacidad de fermentar glucosa, fructosa, trealosa, maltosa y ribosa, y de hidrolizar gelatina, almidón, glucógeno, esculina y N-acetil-glucosamina. Sin embargo, la característica principal de *B. thuringiensis* es que durante el proceso de esporulación produce una inclusión parasporal formada por uno o más cuerpos cristalinos de naturaleza proteica que son tóxicos para distintos invertebrados, especialmente larvas de insectos (Schnepf E. et al, 1998). Estas proteínas se llaman Cry (del inglés, **C**ry**s**tal) y constituyen la base del insecticida biológico más difundido en todo el mundo. La existencia del cuerpo parasporal y sus propiedades tóxicas para insectos son las dos características que diferencian a *B. thuringiensis* de otras especies de *Bacillus* como *B. anthracis*, *B. cereus*, o *B. mycoides* (Sneath P. 1986).

b) **El cuerpo parasporal.** Durante el proceso de esporulación, desde el momento en que tiene lugar el englobamiento de la preespora hasta la formación de la espora madura, *B. thuringiensis* sintetiza uno o varios cristales parasporales, que pueden representar hasta un 30% del peso seco del esporangio (Bulla L. et al, 1980). Estos cristales pueden clasificarse en bipiramidales, cúbicos, cuadrados, aplanados, esféricos y otras formas atípicas menos frecuentes (Khetan S. 2001) (figura 5). Algunos autores han establecido una relación entre la morfología de los cristales y su toxicidad para insectos (López-Meza J. y J. Ibarra J. 1996) pero otros no encuentran relación alguna entre ambas propiedades (Benintende G. et al, 1999).

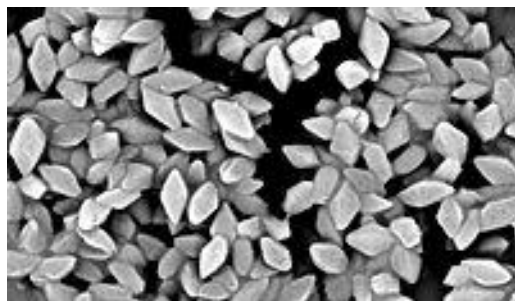


Figura 5. Preparación purificada del cuerpo parasporal de una estirpe de *Bacillus thuringiensis*. Se aprecia la morfología bipiramidal que, en este caso, muestran los cristales proteicos.

El cuerpo parasporal tiene aspecto cristalino, es de naturaleza proteica y se ubica en el interior del esporangio y, por lo general, fuera del exosporio de la espora y ambos son liberados tras la lisis celular (figura 6). Existen algunos casos en que se describen cristales dentro del exosporio, por lo que continúan junto a las esporas tras la lisis (Huber H. y P. Lüthy. 1991) (López-Meza J. y J. Ibarra. 1996). En otro caso muy atípico, se pudo observar que los cristales se forman fuera del exosporio, pero ambos permanecen indefinidamente dentro de un esporangio que no se lisa (Sauka, D.H. y G. B. Benintende. 2008). Este comportamiento puede preservar al cristal de una rápida degradación que a veces se produce en los suelos por acción de los microorganismos

presentes (West, A., H. Burges, R. White y C. Wyborn. 1984) o por inactivación por la radiación ultravioleta (Liu, Y. et al, 1993).

El material proteico que constituye el cuerpo parasporal es tóxico para larvas de insectos y por ello recibe también el nombre de endotoxina δ , también conocidas como proteínas Cry. Se han encontrado endotoxinas δ activas contra insectos lepidópteros (mariposas), coleópteros (escarabajos), dípteros (mosquitos), himenópteros (hormigas), y también contra ácaros y otros invertebrados como nemátodos, gusanos planos y protozoos.

Se ha reportado que en algunos casos la mezcla esporas/cristales mata mucho más eficiente que los cristales solos, probablemente porque al germinar la espora, la célula vegetativa produce este conjunto de exotoxinas que aumentan la eficacia de la infección del hospedador.

Poco se sabe sobre el hábitat natural de *Bacillus thuringiensis*; sin embargo, dado su requerimiento vitamínico y de algunos aminoácidos como glutámico, así como su actividad insecticida, se piensa que la forma de vida vegetativa solo se presenta en el interior de los insectos a los que infecta, hasta que esporula y la espora es liberada al medio ambiente donde permanece junto con el cuerpo parasporal, lo que explica su amplia distribución.

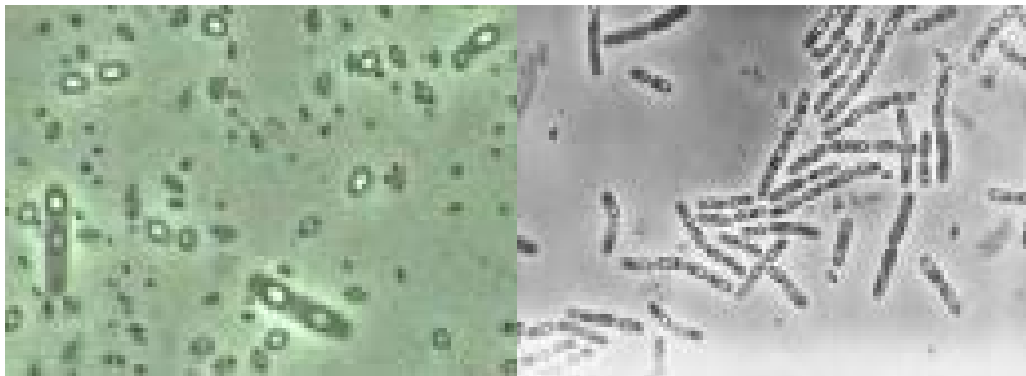


Figura 6. Microfotografías de preparaciones de *Bacillus thuringiensis* en las que se aprecian la espora y el cuerpo parasporal formado junto a ella en el interior de la célula. En la fotografía de la izquierda que corresponde a un cultivo viejo de la bacteria, la mayor parte de las células se han lisado y han puesto en libertad, tanto las esporas como el cuerpo parasporal.

c) **Características de la proteína Cry.** Cada cuerpo parasporal puede estar constituido por una o varias clases de proteína Cry (Ibarra, J. y B. Federici. 1986) (Masson L. et al, 1998) que se agrupan entre sí mediante puentes de disulfuro (Knowles B. 1994), de cuya estabilidad depende el pH de solubilización del cristal imprescindible para que ejerza su acción tóxica. Especialmente en el caso de los cristales bipiramidales cuando estos puentes están distorsionados pueden ser solubilizados a un pH de 9,5, mientras que si permanecen intactos hace falta un pH superior a 12 para lograrlo (Lu H. et al, 1994).

La estructura tridimensional de las proteínas Cry presenta una organización biológicamente relacionada con su actividad, con tres dominios funcionales (figura 7). El dominio I consiste en un paquete de siete α -hélices antiparalelas (hidrofóbas y anfipáticas), la quinta de las cuales está rodeada por las demás. Se considera que este dominio es responsable de la formación de poros en el epitelio intestinal del organismo susceptible, donde una horquilla helicoidal hidrofóbica (α 4- α 5) inicia la generación de una estructura que envuelve las hélices anfipáticas, con las caras hidrofílicas formando el lumen del canal iónico, aunque también podría deberse a la unión de las hélices hidrofóbicas α 5 y α 6 para formar un lazo en el extremo de la estructura abriendo espacio a manera de navaja e insertándose en la superficie de la membrana (Roh J.Y. et al, 2007) (Schnepf E. et al, 1998) (López-Pazos, J. y A. Cerón. 2007) (Pigott C.R., Ellar D.J. 2007).

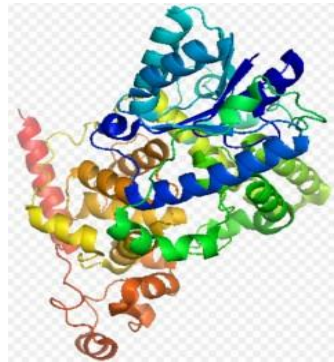


Figura 7. La imagen muestra la estructura tridimensional de las proteínas Cry.

El dominio II tiene tres láminas β antiparalelas distribuidas en una topología tipo “llave griega”, acomodada a manera de un β -prisma. Este dominio presenta similaridad con los sitios de unión antígeno-anticuerpo, y con moléculas del tipo de las lectinas, debido a los loops de superficie expuestos en los ápices de las tres láminas β y por ello se lo considera como la sección que reconoce el receptor.

El último dominio funcional consta de dos láminas β antiparalelas dobladas formando un β sándwich. Esta sección está involucrada en el mantenimiento de la integridad estructural de la toxina ante la proteólisis en el intestino del organismo sensible, participa en la unión al receptor, en la penetración en la membrana celular y en la formación de canales iónicos que generan el desequilibrio osmótico (Bravo A. et al, 2007). Por otra parte, en las diferentes proteínas Cry hay cinco bloques de secuencias de aminoácidos conservados (Schnepf E. et al, 1998). El bloque 1 contiene cinco hélices del dominio I y su estructura altamente conservada hace pensar que está implicado en la formación del poro. La localización central de estas hélices dentro del dominio I sugiere un papel esencial en el mantenimiento de la integridad estructural del haz (Aronson, A.I., y Y. Shai. 2001). El bloque 2 incluye siete hélices del dominio I y la primera lámina β del dominio II, estas dos estructuras comprenden la región de

contacto entre estos dos dominios. Hay tres puentes salinos entre los dominios I y II en las toxinas Cry1Aa y Cry3A, esto puede ser importante si el dominio I cambia su orientación relativa para la interacción con el receptor y para mantener la forma globular de la proteína. Los bloques 3, 4, y 5 están en cada una de las tres cadenas dentro del dominio III (Bravo, A. 2004). El bloque 3 contiene la última lamina β del dominio II, una estructura involucrada en las interacciones entre los dominios I y III. Las dos argininas centrales del bloque 4 estarían implicadas en los puentes salinos, afectando el cristal o a la agregación oligomérica. La primera y última arginina están expuestas a solventes e implicadas en la función del canal.

d) **Mecanismo de acción de la proteína Cry.** El mecanismo de acción de las proteínas Cry se describió inicialmente en lepidópteros y es un proceso de múltiples etapas. En cuanto al mecanismo de acción de las proteínas Cry, los síntomas que se observan a partir de que las larvas de insectos susceptibles ingieren los cristales y esporas de *Bacillus thuringiensis* son: cese de la ingesta, parálisis del intestino, vómito, diarrea, parálisis total y finalmente la muerte. El mecanismo de acción de las proteínas Cry es un proceso de varios pasos: (1) solubilización del cristal que, en realidad no es tóxico en estado nativo y, por ello, se denomina protoxina, (2) procesamiento de las protoxinas en el intestino medio de la larva que presenta pH alcalino y en el que la protoxina experimenta una proteólisis enzimática y da origen a la toxina activa, (3) unión de la toxina a un receptor específico de las membranas de las células epiteliales del intestino, específicamente las que forman las microvellosidades intestinales, (4) inserción a la membrana, (5) agregación y formación de poro y (6) citólisis (figura 8). Los cristales de *B. thuringiensis* son ingeridos y luego solubilizados en el intestino medio del insecto tras lo cual se liberan las proteínas cristalinas en forma de protoxinas. Estas no producirán el daño *per se*, sino que deberán ser procesadas por proteasas intestinales para generar las toxinas activas que llevarán a la muerte de la larva (Bravo A. et al, 2004). Bajo su forma monomérica, las toxinas atraviesan la membrana peritrófica (que es una membrana existente en el intestino medio de los insectos, formada por quitina y proteína, que impide a los alimentos entrar en contacto directo con las células epiteliales) y se unen de forma univalente a la cadherina, con gran afinidad en la cara apical de la membrana epitelial (Griko N. et al, 2004). Luego, de acuerdo con estudios realizados en cultivos de células de insectos, se inicia una cascada de señalización dependiente del ion magnesio que sería responsable de la muerte celular (Zhang X. et al 2006). Además, el inicio de esa cascada de señalización estimula la exocitosis de cadherina desde vesículas intracelulares hacia la membrana apical de la célula y aumenta el número de receptores; por tanto, captura un número mayor de toxinas libres que amplificarían la señal inicial (Zhang, X. et al, 2008). Por otro lado, con base en experimentos *in vitro* y bioensayos, se propone que la unión de los monómeros a la cadherina facilita la hidrólisis proteolítica sobre el extremo N-terminal de la toxina (Gómez I. et al 2002) (Jiménez-Juárez N. et al 2007). Esta última hidrólisis induce el ensamble de los monómeros y establece una forma

oligomérica pre-poro. Esta estructura incrementa la afinidad por un receptor secundario como puede ser la aminopeptidasa N o la fosfatasa alcalina (Jurat-Fuentes J. y M. Adang. 2004). Por último, la unión a ese segundo receptor facilita la formación de un poro en el epitelio del intestino medio, lo que provoca un desequilibrio osmótico y la consecuente lisis celular (Bravo A. et al 2004). El tejido intestinal resulta dañado gravemente, lo que impide la asimilación y retención de compuestos vitales para la larva y lleva a la muerte del insecto. La muerte puede acelerarse al germinar las esporas y proliferar las células en el hemocele del insecto (de Maagd, R. et al, 2001) (Schnepf E. et al 1998), aunque algunos autores sostienen que también participarían en la muerte bacterias entéricas que llegarían desde el intestino hasta el hemocele causando una septicemia (Broderick, N et al, 2006).

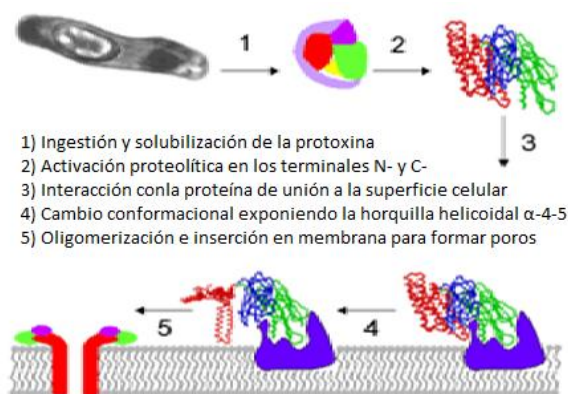


Figura 8. Modelo propuesto para explicar el modo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*

El uso de *B. thuringiensis* como bioinsecticida tiene ventajas evidentes porque sustituye con ventaja la utilización de insecticidas químicos. Se ha estimado que el 2% del mercado mundial de pesticidas es satisfecho con biopesticidas, en el que *B. thuringiensis* domina el 95% de las ventas. Varios han sido los factores que han hecho posible su éxito en la agricultura. El más importante es su alta especificidad hacia el insecto diana y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas e inclusive otros insectos benéficos. Las toxinas de *B. thuringiensis* se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años, principalmente en cultivos de hortalizas y cereales. *B. thuringiensis* ha sido utilizado como una alternativa compatible con el medio ambiente para el manejo de plagas agrícolas. Otro factor limitante ha sido la utilización de *B. thuringiensis* para el control de insectos barrenadores y chupadores, ya que la aplicación de productos de *B. thuringiensis* se ha dado tradicionalmente como productos asperjados y el hábito alimenticio de estos insectos impide la ingestión de la toxina Cry. Este problema se ha resuelto con la creación de plantas transgénicas que producen sistémicamente la toxina Cry haciéndola accesible a insectos barrenadores. Existe el riesgo de desarrollo de resistencias por el incremento en el uso de *B. thuringiensis*, como aspersiones de

cristales y sobre todo en plantas transgénicas que expresen constitutivamente una o varias toxinas Cry. Esto podría sustituir gradualmente las poblaciones sensibles por otras resistentes, con lo cual no sólo se vería reducida la efectividad del bioinsecticida, sino que se reduciría la variabilidad genética de las poblaciones de insectos. Una de las estrategias más atractivas y a la vez más controvertidas, se refiere a la transformación de las plantas de cultivo con los genes heterólogos. El objetivo es que la planta, una vez transformada con el gen de la toxina, exprese suficiente cantidad de ésta como para aniquilar a las plagas susceptibles que las consumen. La adopción de las plantas transgénicas en la agricultura se está llevando a cabo en forma vertiginosa. Sólo en Estados Unidos, el 50% de la superficie sembrada con soja consistió de plantas transgénicas resistentes a herbicidas. Las dos principales características transgénicas comercializadas hasta la fecha son la tolerancia a herbicidas y la resistencia a plagas basadas en genes de *B. thuringiensis*. La introducción de plantas transgénicas a nuestro país ha sido estrictamente regulada.

Conclusión

El uso de bioinsecticidas en los últimos años ha evolucionado mucho frente a los bioinsecticidas tradicionales puesto que los primeros son menos dañinos, provocan una menor carga ambiental, atacan solamente a la plaga o a la especie diana y además son eficaces en cantidades pequeñas descomponiéndose rápidamente. Entre las principales aplicaciones de los bioinsecticidas en el control de plagas producidas por insectos destacan actualmente el uso de baculovirus, principalmente los nucleopoliedrovirus y los granulovirus. También es importante el uso de hongos entomopatógenos puesto que la mayoría de los insectos son sensibles a alguna enfermedad de etiología fúngica, así como el uso de nematodos y protozoos. Sin embargo es *Bacillus thuringiensis* la bacteria más empleada para el control de plagas puesto que ha desarrollado mecanismos moleculares para producir toxinas activas frente a insectos, siendo la mayoría codificadas por los genes *cry*. Su gran efectividad se debe a su alta especificidad hacia el insecto diana y su inocuidad para mamíferos, otros vertebrados, plantas... Sin embargo, también presenta algunos inconvenientes que se ven solventados con el cultivo de plantas transgénicas. La adopción de este tipo de plantas en la agricultura se está llevando a cabo de manera vertiginosa. En la actualidad existen ocho cultivos importantes con cultivares transgénicos (soja, maíz, algodón, colza, papa, tomate, tabaco y remolacha).

Conclusion

The use of bioinsecticides in recent years has evolved considerably compared to traditional bioinsecticides because they are less harmful, cause a lower environmental burden, attack only the pest or the target species, and they are effective in small amounts with a rapid decomposition. Among the main applications of bioinsecticides in insect-produced-pests control are the use of baculoviruses, mainly nucleopolyhedroviruses and granuloviruses. The use of entomopathogenic fungi is also important since most insects are sensitive to some disease of fungal etiology, as well

as the use of nematodes and protozoa. However, *Bacillus thuringiensis* is the most widely used bacterium for pest control since it has developed molecular mechanisms to produce toxins active against insects, most of which are encoded by *cry* genes. Its great effectiveness is due to its high specificity towards the target insect and its safety for mammals, other vertebrates, plants ... However, it also presents some disadvantages that are solved with the cultivation of transgenic plants. The adoption of this type of plants in agriculture is taking place in a vertiginous way. Currently there are eight important crops with transgenic cultivars (soybeans, maize, cotton, canola, potato, tomato, tobacco and beet).

Referencias bibliográficas

1. Aronson, A.I., y Y. Shai. 2001. Why *Bacillus thuringiensis* insecticidal toxins are so effective: unique features of their mode of action. FEMS Microbiology Letters, 195: 1-8.
2. Benintende G., J. López-Meza, J. Cozzi y J. Ibarra. 1999. Novel non-toxic isolates of *Bacillus thuringiensis*. Lett. Appl. Microbiol. 29: 151-155.
3. Bravo A., S.S. Gil y M. Soberón. 2007. Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. Toxicon, 49: 423-435.
4. Bravo, A. 2004. Mecanismo de acción de las proteínas bioinsecticidas de *Bacillus thuringiensis*. En: Bravo, A. y J. Cerón (eds) *Bacillus thuringiensis* en el control biológico. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. pp. 69-100.
5. Bravo A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez y R. Miranda. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to amino-peptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim Biophys Acta, 1667: 38-46.
6. Broderick, N, K. Raffa y J. Handelsman. 2006. Midgut bacteria required for *Bacillus thuringiensis* insecticidal activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 15196-15199.
7. Bulla L. D. Bechtel, K. Kramer, Y. Shethna, A. Aronson y P. Fitz-James. 1980. Ultrastructure, physiology, and biochemistry of *Bacillus thuringiensis*. CRC Crit Rev Microbiol 8: 147-204.
8. De Maagd, R., A. Bravo y N. Crickmore. 2001. How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. Trends Genet., 17: 193-199.
9. Gerling, D. 1986. Natural enemies of *Bemisia tabaci*, biological characteristics and potential as biological control agents: a review. Agriculture, Ecol Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam.

10. Gómez, I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo y M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett., 513: 242-246.
11. Gordon R, W. Haynes y C. Pang. 1973. The genus *Bacillus*. En: US Department of Agriculture handbook N° 427. Washington DC., USDA, pp. 109-26.
12. Griko N., L. Rose-Young, X. Zhang, L. Carpenter, M. Candas y M.A. Ibrahim MA. 2007. Univalent binding of the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* to a conserved structural motif in the cadherin receptor BT-R1. Biochemistry, 46: 10001-10007.
13. Granados, R. R. & K. A. Williams. 1986. In Vivo infection and replication of baculoviruses, pp.89-108. In: R.R. Granados y B.A. Federici (eds.). The biology of baculoviruses. Vol.I. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
14. Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. El-Sayed y C. M. Ignoffo. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol., 64:13-17.
15. Hajek, A. E. y R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol., 39:293-322.
16. Huber H. y P. Lüthy. 1991. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin: composition and activation. En Davidson, A. (ed.). Pathogenesis of invertebrate microbial diseases. New Jersey, U.S.A.
17. Ibarra, J. y B. Federici. 1986. Isolation of a relatively nontoxic 65-kilodalton protein inclusion from the parasporal body of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. J. Bacteriol., 165: 527-533.
18. Ibarra, J.E., M. C. Del Rincón Castro, E. Galindo, M. Patiño, L. Serrano, R., J. A. Carrillo, B. Pereyra-Alfárez, A. Alcázar-Pizaña, H. Luna-Olvera, L. Galán-Wong, L. Pardo, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, M. Soberón y A. Bravo. 2006. Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos. Rev. Latinoam. Microbiol., 48 (2): 113-120.
19. Jiménez-Juárez, N, C. Muñoz-Garay, I. Gómez, G. Saab-Rincón, J. Damián-Almazo y S. Gill. 2007. *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab mutants affecting oligomer formation are non-toxic to *Manduca sexta* larvae. J. Biol. Chem., 282: 21222-21229.

20. Jurat-Fuentes, J. y M. Adang. 2004. Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. Eur. J. Biochem., 271: 3127- 3135.
21. Khetan S. 2001. Bacterial Insecticide: *Bacillus thuringiensis*. En: Khetan, S. (ed). Microbial Pest Control, p. 14.
22. Knowles B. 1994. Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal δ -endotoxins. Advan. Insect. Physiol., 24: 175-308.
23. Liu, Y., M. Sui, D. Ji, I. Wu, C. Chou y C. Chen. 1993. Protection from ultraviolet irradiation by melanin of mosquitocidal activity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. J. Invertebr. Pathol., 62: 131-136.
24. López-Meza J. y J. Ibarra J. 1996. Characterization of a Novel Strain of *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol., 62: 1306-1310.
25. López-Pazos, J. y A. Cerón. 2007. Three-dimensional structure of *Bacillus thuringiensis* toxins: a review. Acta Biol. Colomb., 12: 19-32.
26. Lu, H., F. Rajamohan y D. Dean D. 1994. Identification of amino acid residues of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin CryIAa associated with membrane binding and toxicity to *Bombyx mori*. J. Bacteriol., 176: 5554-5559.
27. Masson, L., M. Erlandson, M. Puzstai-Carey, R Brousseau, V. Juárez-Pérez y R. Frutos. 1998. A holistic approach for determining the entomopathogenic potential of *Bacillus thuringiensis* strains. Appl. Environ. Microbiol., 64: 4782-4788.
28. Monzón, A. 2001. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Costa Rica, 63: 95-103.
29. Osborne, L. S., G. K. Storey, C. W. McCoy y J. F. Walter. 1990. Potential of controlling the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*, pp. 386-390. In: "Proceedings and abstracts of 5 International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control". Adelaide, Australia.
30. Pigott C.R., Ellar D.J. 2007. Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 71: 255–281.
31. Rodríguez, S.M., M. Gerding y A. France. 2006. Selección de aislamientos de hongos entomopatógenos para el control de huevos de la polilla del tomate, *Tuta absoluta* Meyrich (Lepidoptera: Gelechiidae). Agricultura técnica. Chile, 66 (2): 151-158.

32. Roh, J.Y., J.Y. Choi,, M.S Li, B.R. Jin y Y.H. Je. 2007. *Bacillus thuringiensis* as a specific, safe, and effective tool for insect pest control. J. Microbiol. Biotechnol., 17: 547–559.
33. Sauka, D.H. y G. B. Benintende. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades. Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. Arg. Microbiol. 40: 124-140.
34. Schnepf E., N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler y D.H. Dean, 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62: 775–806.
35. Sneath P. 1986. Spore forming gram-positive rods and cocci. En: Butler, J. (ed) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, pp. 1104-1207/ 1104-1207.
36. Tanada, Y. y H. K. Kaya. 1993. Insect pathology, 666p. Academic Press. San Diego, California.
37. Tinsley, T.W. & D. C. Kelly. 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. pp.3-25. In: K. Maramorosh y K.E. Sherman (eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press. Orlando, Florida.
38. Viñuela, E. y J. Jacas. 1993. Los enemigos naturales de las plagas y los plaguicidas. Ministerio de Agricultura. H.D. 2-93. Madrid. 24 pp.
39. Viñuela, E. 2000. La resistencia a insecticidas y plagas de hortícolas en España. I Jornadas sobre Producción Integrada. Ed. Asociación AGRO. Universidad de Almería. Almería.
40. Vlak, J. M. 1992. The biology of baculovirus *In Vivo* and In Cultured Insect Cells. pp.2-10. In: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (eds.). Baculovirus and recombinant protein production processes. Editions Roche. Interlakend, Switzerland.
41. West, A., H. Burges, R. White y C. Wyborn. 1984. Persistence of *Bacillus thuringiensis* parasporal crystal insecticidal activity in soil. J. Invertebr. Pathol., 44: 128-133.
42. Zhang, X., M. Candas, N. Griko, R. Taussig y L. Bulla Jr. 2006. A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. Proc Natl Acad Sci USA, 103: 9897-9902.
43. Zhang, X., N. Griko, S. Corona y L. Bulla Jr. 2008. Enhanced exocytosis of the receptor BT-R(1) induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis* directly correlates to the execution of cell death. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol., 149: 581-588.

