

Capítulo 21

Nuevas estrategias para el control biológico de insectos

Chapter 21

Novel strategies for insect biological control

Carlos Espinel Correal,¹ Gloria Patricia Barrera Cubillos,¹
Lissette Aracelly Torres Torres,¹ Juliana Andrea Gómez Valderrama,¹
Paola Emilia Cuartas Otalora,¹ Felipe Borrero Echeverry,¹
Laura Fernanda Villamizar Rivero²

¹ Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

² AgResearch Ltd. Lincoln Science Centre

Contenido

Introducción926

El uso de microesclerocios como estrategia promisorio para el control biológico926

Nueva estrategia para el control de plagas basado en silenciamiento génico ...929

 ARN interferente929

Uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biológica932

 Quitinasas933

 Proteínas derivadas de baculovirus934

 Toxinas935

Combinación de microorganismos en el control de insectos plaga936

 Hongos entomopatógenos con otros microorganismos936

 Coinfecciones virales: virus - virus938

Conclusiones y perspectivas943

Agradecimientos943

Referencias944

Resumen

Muchos insecticidas de síntesis química se han convertido en un método insostenible para el manejo de insectos plaga, mientras que los bioplaguicidas a base de microorganismos entomopatógenos han emergido en las últimas décadas como una alternativa para la agricultura sostenible. En el presente capítulo se mostrará el uso de entomopatógenos que podrían estar involucrados en el desarrollo de bioinsecticidas de nueva generación. Se mostrarán los avances hechos con el aprovechamiento de microesclerocios como estructuras de resistencia y una forma novedosa de producción y de liberación de propágulos en el campo. Se mencionarán las ventajas y el camino por recorrer al utilizar la estrategia de silenciamiento génico que aprovecha el desarrollo de las ómicas como nuevas tecnologías en biología molecular. De igual forma, se abordará otra estrategia promisorio, que es el uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biocontroladora, como toxinas, quitinasas o de proteínas derivadas de baculovirus. La estrategia de combinación de microorganismos que aprovechan eventos de sinergismo, adición o de coinfección es la que lleva más tiempo de uso, sin embargo, aún falta por conocer mayores detalles al respecto y, por ende, sigue teniendo un gran potencial si se aprovechan todos los atributos que pueden tener los microorganismos evaluados.

Palabras clave

Control biológico, coinfección, entomopatógenos, esclerocio, silenciamiento génico

Abstract

Most chemical synthesis insecticides have become an unsustainable method to control insect pests. Biopesticides based of entomopathogens microorganisms have emerged as an alternative for a sustainable agriculture in the past decades. This chapter will discuss different strategies that might be used in the development of next generation biopesticides. In order to provide resistance against abiotic factors, and as a novel method for the production and release of propagules, microsclerotia are being developed. From a molecular standpoint, the advantages and perspectives of gene silencing, taking advantage of the “omics”, will be explored. Another promising strategy involves enhancing the activity of biopesticides by reducing lethal doses, decreasing the time they require to kill insects, or increase the species range they affect. One alternative is the use of metabolites such as toxins, enzymes or baculovirus-derived proteins as additives. Alternately, combining microorganisms to take advantage of synergism, additive effects or coinfection, is currently the most used strategy to enhance biopesticide activity, however, it remains understudied and its full potential has yet to be taken advantage of.

Keywords

Biological control, co-infection, entomopathogens, gen silencing, sclerotia

Introducción

En los capítulos anteriores hemos hecho un recorrido por las estrategias de control biológico de insectos con diferentes microorganismos (hongos, bacterias, virus) como principio activo de las plagas blanco. Sin embargo, han sido usados de la manera “tradicional” mediante la aplicación del microorganismo en forma individual, enfrentados a todas las condiciones bióticas y abióticas que puedan experimentar y que en capítulos pasados se han mencionado. Además, muchos otros factores pueden amenazar el éxito de esta estrategia, tales como la conversión de hábitats no especializados en agricultura a otros estrictamente agrícolas, lo que reduciría el éxito reproductivo de los agentes de control y su capacidad de dispersión en el nuevo ambiente. El cambio climático, las modificaciones en la sincronía entre el entomopatógeno y el hospedero, las invasiones de nuevas especies o el resurgimiento de especies plaga secundarias y la reducción de la biodiversidad también pueden influenciar en el éxito del control microbiológico.

Por tal razón, en este capítulo nos centraremos en algunas estrategias que se podrían considerar novedosas desde la visión tradicional para atacar el problema de los insectos plaga. Estas comprenden desde la producción, el manejo y el sistema de entrega al ambiente hasta el aprovechamiento de otros compuestos que contribuyan a dar un valor agregado al producto final. En este mundo de cambios tan rápidos, muchas estrategias mencionadas han tenido mayor oportunidad de desarrollo e implementación con sus variantes, pero hay otras que hasta estos últimos años se han empezado a trabajar, y a medida que se han abierto puertas u obtenido respuestas se van encontrando nuevos retos o preguntas por resolver. Son, entonces, algunas de estas opciones, apuestas con miras a resolver problemas de origen antiguo, pero con nuevos retos como fruto del avance de la frontera del conocimiento y de los inexorables cambios de nuestro entorno.

El uso de microesclerocios como estrategia promisoría para el control biológico

La estabilidad de los propágulos fúngicos en el ambiente se ve afectada por factores bióticos y abióticos como la temperatura, la radiación solar, el pH y la desecación (Lingg & Donaldson, 1981). Las estructuras fúngicas más utilizadas como ingrediente activo de bioproductos para el control de insectos plaga y enfermedades son los conidios. Los conidios son esporas asexuales y son responsables de la actividad biocontroladora. Estos propágulos se dispersan en el medio ambiente gracias a las corrientes del viento, el movimiento del agua y los insectos, entre otros. La producción masiva de conidios se realiza principalmente mediante procesos de fermentación sólida y bifásica (líquido-sólido) utilizando diferentes sustratos sólidos de origen vegetal que son, generalmente, de tipo lignocelulósicos con variable contenido de almidón (Prabhakar, Krishnaiah,

Janaun, & Bono, 2005). Los sustratos naturales presentan algunas desventajas: la principal es que la fuente de carbono hace parte de la estructura; cuando el microorganismo crece, el medio sólido se degrada y cambia sus características físicas, como la porosidad, y, en la mayoría de los casos, su capacidad de transferir calor y masa se reduce (Barrios-González, 2012; Barrios-González & Mejía, 1996; Manpreet, Sawraj, Sachin, Pankaj, & Banerjee, 2005). El escalamiento de los procesos de fermentación sólida es difícil de implementar, debido a que presenta problemas en el control de la temperatura, la transferencia de oxígeno, el pH y la humedad (gradientes) (Dos Santos, Da Rosa, Dal'Boit, Mitchell, & Krieger, 2004; Maurel, Orliaca & Christen, 2003); además, son altamente demandantes de mano de obra y generan grandes volúmenes de desechos sólidos, de manera que estos

problemas impactan negativamente la factibilidad técnica y económica de diferentes bioinsumos a base de conidios.

Una estructura reproductiva asexual alternativa a los conidios son los esclerocios, los cuales se caracterizan por ser partículas sólidas, compactas y de forma y tamaño relativamente regular, capaces de sobrevivir por largos períodos de tiempo en estado de latencia (Willetts, 1971). Los esclerocios se forman a partir de una masa de hifas que se empaqueta y compacta, y se diferencian como agregados de tejido que madura y se melaniza. Estas estructuras ayudan a los hongos a sobrevivir en condiciones adversas como el congelamiento, la desecación y la ausencia de hospederos. El tamaño de los esclerocios es muy variable, depende de la especie fúngica y las condiciones durante su formación, y pueden medir varios milímetros o ser de tamaño micrométrico; en el segundo caso se denominan *microesclerocios* (Smith, Henkel, & Rollins, 2015). Los microesclerocios (MS) son estructuras comunes en varios hongos fitopatógenos, como en el caso de *Verticillium albo-atrum*, cuyos microesclerocios son altamente persistentes en el ambiente y sobreviven en el suelo entre 6 y 12 años (Huisman & Ashworth, 1976, citado por Goble, Gardescu, Fisher, Jackson, & Hajek, 2016). Aunque esta estructura ha sido conocida y estudiada para diferentes patógenos vegetales, fue solo recientemente que se describió para algunos hongos entomopatógenos, como *Metarhizium anisopliae* (Jackson & Jaronski, 2009; Jaronsky & Jackson, 2008), *Metarhizium brunneum* (Behle & Jackson, 2014), *Nomuraea rileyi*, ahora reclasificado como *Metarhizium rileyi* (Song et al., 2013), *Purpureocillium lilacinum* (Song, Shen, Zhong, Yin, & Wang, 2016) y el hongo antagonista *Trichoderma harzianum* (Kobori, Mascarín, Jackson, & Schisler, 2015).

La producción masiva de microesclerocios (MS) de hongos biocontroladores se realiza en cultivo sumergido, donde la relación carbono-nitrógeno del medio juega un papel fundamental, aunque el tiempo de fermentación se considera el parámetro crítico en términos de la formación de estas estructuras, su endurecimiento y su melanización (Jackson & Jaronski, 2012). Los tiempos de fermentación reportados para la producción de microesclerocios de diferentes hongos benéficos oscilan entre cuatro y siete días (Jackson & Jaronski, 2012; Kobori et al., 2015; Song et al., 2013);

la formación se inicia a partir del segundo día, con su subsecuente crecimiento, compactación y melanización durante los siguientes días (Jackson & Jaronski, 2012). Los rendimientos han sido variables, con valores entre $2,6 - 4,2 \times 10^4$ MS mL⁻¹ para *M. brunneum* (Jackson & Jaronski, 2012), $1,5 - 2,5 \times 10^4$ MS mL⁻¹ para *T. harzianum* (Kobori et al., 2015), $3,84 \times 10^4$ y $2,1 \times 10^5$ MS mL⁻¹ para *M. rileyi* (Song, Lin, Du, Yin & Wang, 2017; Song et al., 2013) y $1,1 \times 10^5$ MS mL⁻¹ para *P. lilacinum* (Song et al., 2016).

Bajo condiciones adecuadas de humedad y temperatura, los microesclerocios germinan, producen micelio y posteriormente esporulan produciendo conidios (figura 21.1), por lo que la utilización de microesclerocios de hongos entomopatógenos y antagonistas se perfila como una estrategia factible e innovadora para la liberación de propágulos fúngicos que posteriormente producen una cantidad importante de inóculo infectivo.

Los MS han sido principalmente formulados como gránulos y utilizan diferentes soportes sólidos, como caolín, celulosa y tierra de diatomeas (Goble et al., 2016); este último es el más empleado. Para formulación de pequeños volúmenes, el protocolo descrito por Kobori et al. (2015) consiste en adicionar 5 g de tierra de diatomeas a 100 mL de cultivo líquido una vez terminada la fermentación. La mezcla se filtra al vacío y la torta obtenida se quiebra, se distribuye en la superficie de una placa y se seca toda la noche con aire a 22 °C hasta humedades inferiores al 5 %.

Formulaciones de microesclerocios de diferentes hongos han sido evaluadas a nivel de laboratorio y campo para el control de algunas plagas y enfermedades. Por ejemplo, Goble et al. (2016) estudiaron la producción de conidios, la persistencia y la patogenicidad de microesclerocios de *M. brunneum* F52 en una formulación líquida para el control del escarabajo asiático de los cuernos (*Anoplophora glabripennis*) en cultivos forestales. En este trabajo los microesclerocios formulados produjeron conidios infectivos durante 30 días en condiciones de campo y la producción se vio positivamente influenciada por la alta humedad relativa, la alta temperatura y los períodos de lluvia. Los conidios producidos por los microesclerocios en el campo fueron evaluados en condiciones de laboratorio y evidenciaron alta patogenicidad, con tiempos letales medios entre



Fotos: Laura Fernanda Villamizar

Figura 21.1. Microesclerocios de *Beauveria pseudobassiana*. a. Microesclerocio; b. Microesclerocio germinado; c. Conidiación a partir de microesclerocio germinado.

15,5 y 21,5 días sobre hembras adultas de la plaga. Behle, Richmond, Jackson y Dunlap (2015) evaluaron los microesclerocios de este mismo aislamiento de *M. brunneum* F52 para el control de larvas del escarabajo japonés (*Popillia japonica*) en condiciones de laboratorio y campo en cultivos de pastos. Los microesclerocios se utilizaron en formulación líquida y en gránulos y se compararon con formulaciones comerciales de conidios de este mismo hongo y con los insecticidas químicos Imidacloprid y Trichlorfon. Las formulaciones del hongo redujeron significativamente la densidad de larvas en comparación con el control no tratado, con niveles de control entre 38,6 % y 69,2 %, que en algunos casos resultaron similares a los obtenidos con los agroquímicos evaluados. La formulación en gránulos fue también evaluada por Behle, Jackson y Flor-Weiler (2013) para el control de ninfas de la garrapata *Ixodes scapularis*. En dicho trabajo, se determinó que los microesclerocios aplicados sobre mezcla para macetas mantenidos bajo condiciones controladas fueron capaces de producir conidios durante dos semanas y los conidios permanecieron viables por ocho semanas después de la aplicación. Las ninfas fueron susceptibles a la infección y se alcanzaron mortalidades entre el 56 % y el 74 %.

En otra investigación, los microesclerocios del hongo biocontrolador de fitopatógenos *Trichoderma harzianum* fueron también producidos en fermentación líquida y evaluados para el control del *damping off* causado por *Rhizoctonia solani* en semilleros de melón (Kobori et al., 2015). La incorporación de gránulos en el suelo mejoró la emergencia de plantas y redujo en un 90 % la incidencia de la enfermedad, incrementando así la sobrevivencia de las plantas de melón. Esta formulación demostró además una alta estabilidad, ya que mantuvo la misma producción de conidios por gramo de granulado después de 12 meses de almacenamiento a temperatura ambiente (Kobori et al., 2015).

En conclusión, los microesclerocios de los hongos biocontroladores son una estructura con alto potencial para el desarrollo de una nueva generación de bioproductos. Se trata, entonces, de un ingrediente activo tolerante a condiciones de estrés como la desecación, con alta persistencia en campo y con capacidad de multiplicarse, producir y liberar grandes cantidades

de propágulos activos en el ambiente. Además, tiene ventajas adicionales, como la facilidad para producirlos en sistemas de fermentación líquida utilizando medios de cultivo simples y económicos, que además pueden ser fácilmente estandarizados, escalados y controlados para obtener altos rendimientos y reproducibilidad entre lotes de producción. Aunque por ser estructuras de resistencia es posible que no requieran el desarrollo de formulaciones de alta complejidad, es importante

el desarrollo de formulaciones adecuadas con algunos adyuvantes y fuentes nutricionales que podrían mejorar el desempeño ecofisiológico de los microesclerocios en campo. A pesar de las ventajas de estas estructuras, actualmente son pocos los trabajos desarrollados sobre producción, formulación y evaluación de formulados a base de microesclerocios, que son una herramienta novedosa que podría reemplazar los bioproductos fúngicos a base de conidios, blastosporas o micelio.

Nueva estrategia para el control de plagas basado en silenciamiento génico

Para el control de insectos plaga se han desarrollado diversas estrategias que incluyen el uso de insecticidas de síntesis química y organismos vivos presentes en el medio ambiente (Mazid, 2011). Una nueva generación de controladores biológicos se basa en la combinación de moléculas, metabolitos secundarios y otros adyuvantes que mejoran las características insecticidas. Con el desarrollo de nuevas tecnologías en biología molecular (ómicas) se generó un auge de nuevas y revolucionarias estrategias para el control de plagas. Es así que se ha identificado una gran variedad de proteínas con acción insecticida y se introdujo el concepto de *plantas resistentes* que expresan estas proteínas en las denominadas *plantas transgénicas*. Sin embargo, esta estrategia no ha sido infalible y se han desarrollado resistencias de algunos insectos, por lo cual la búsqueda de nuevas formas de control con nuevos modos de acción es constante.

ARN interferente

El descubrimiento de un mecanismo de silenciamiento génico denominado *ARN interferente* (ARNi) dio inicio al desarrollo de una nueva generación de aplicaciones para el control de insectos plaga. El mecanismo de ARNi es empleado de manera natural por organismos eucariotas para la regulación de la expresión génica, el reordenamiento genómico y la defensa contra ácidos nucleicos foráneos (Carthew & Sontheimer, 2009; Perrimon, Ni, & Perkins, 2010). El ARNi funciona como un "silenciador de genes" específico de secuencia

de ARN, el cual genera la degradación o, en algunos casos, la inhibición de la traducción del ARN blanco (Fire et al., 1998).

Las primeras observaciones de este mecanismo de silenciamiento se realizaron con el gen en la enzima nopalina sintasa (NOS) en plantas de tabaco (Rothstein, DiMaio, Strand, & Rice, 1987) y posteriormente se definieron las características moleculares del proceso de interferencia mediante la aplicación de ARN de doble cadena (ARNdc) exógeno en el nematodo *Caenorhabditis elegans*, el cual silenció un ARNm endógeno y se denominó *ARN interferente* (Fire et al., 1998). En este sistema se describió que moléculas de ARNdc con secuencia específica de un gen blanco pueden ingresar por el tracto digestivo del nematodo e inducir la disminución de su transcripción (Timmons, Court, & Fire, 2001). Debido a que el silenciamiento de genes bajo este mecanismo es conservado en células eucariotas (Fire, 2007), se convirtió en una herramienta fundamental para estudios de genómica funcional en insectos. La descripción del funcionamiento general del mecanismo se muestra en el capítulo 20, "Nuevas estrategias para el control de fitopatógenos".

En resumen, el mecanismo de ARN interferente en insectos involucra una enzima denominada *Dicer* (del tipo RNasa III), la cual rompe las moléculas de ARNdc en secuencias más pequeñas (21-24 pares de bases) denominadas *siARN* o *miARN*, según su biogénesis; estas son incorporadas en un complejo con múltiples subunidades denominado *RISC* (del inglés *RNA-induced silencing complex*), que realiza el silenciamiento identificando y capturando ARNm citoplasmático

complementario para evitar su transcripción. Aunque en plantas, nematodos y hongos se describió la acción de un ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRP) para amplificar el mecanismo de interferencia mediante la formación de nuevas moléculas de siARN, en insectos esta enzima no tendría homólogos (Gordon & Waterhouse, 2007), por lo tanto, podrían existir mecanismos análogos para esta función, los cuales son de vital importancia para que el silenciamiento sea sistémico en insectos.

ARN interferente en el control de plagas

La investigación en ARN interferente en el campo de la entomología ha demostrado ser útil en el estudio de la función, la regulación y la expresión de genes, con modelos como *Drosophila melanogaster*, *Tribolium castaneum* y *Bombyx mori* (Arakane, Specht, Kramer, Muthukrishnan, & Beeman, 2008; Hossain et al., 2008; Miller, Brown, & Tomoyasu, 2008). En diversos trabajos se emplea esta tecnología para analizar genes involucrados en el desarrollo, en aspectos fisiológicos generales, en la reproducción, en el comportamiento y en las vías biosintéticas de los insectos. Esta aplicación también se enfoca al desarrollo de alternativas de control de plagas buscando genes específicos para bloquear el desarrollo, la reproducción u otros que sean vitales en la supervivencia del insecto (De Andrade & Hunter, 2016).

Teniendo en cuenta que la molécula desencadenante del mecanismo ARNi es el ARNdc, los primeros trabajos en control se basaron en el desarrollo de plantas transgénicas que expresan este tipo de moléculas con secuencia complementaria a genes blanco de insectos. Así, las moléculas pioneras se realizaron sobre la subunidad A del gen de ATPasa (V-ATPasa) y el gen de citocromo P450 (CYP6AE14) para control de *Diabrotica virgifera virgifera* Leconte (Coleoptera: Chrysomelidae) y *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) (Baum et al., 2007; Mao et al., 2007). Estos trabajos introdujeron el mecanismo de RNAi inducido por el hospedero en insectos (HI-RNAi, del inglés *host-induced RNAi*) para su control (Gordon & Waterhouse, 2007), donde el insecto consume parte de la planta para adquirir el ARNdc, el cual, en

el intestino, induce el mecanismo que silencia el gen. Mamta y Rajam (2017) publicaron una tabla resumen de los desarrollos de HI-RNAi para el control de plagas.

Posteriormente se introdujo el concepto de ARNi ambiental, en el cual el mecanismo de ARNi es inducido después de la exposición del insecto al ARNdc por administración oral o tópica (Kupferschmidt, 2013). A partir de allí se han publicado un gran número de trabajos encaminados al desarrollo de una alternativa de control biológico basado en ARNi, que sea específica y evite daños colaterales del ecosistema.

Selección del gen blanco y producción de ARNdc

Los genes candidatos para el desarrollo de ARNi son aquellos de función conocida. Se han empleado genes de enzimas detoxificantes, síntesis celular, nutrición, metabolismo y citoesqueleto, los cuales han sido seleccionados con base en diferentes tecnologías denominadas ómicas, incluyendo librerías EST (del inglés *expressed sequence tags*) y RNAseq para la caracterización de transcriptomas, entre otros. La selección puede estar basada en genes muy específicos o de amplio espectro, dependiendo de la variabilidad de la región genómica empleada. La mayor especificidad se logra sobre regiones UTR (del inglés *untranslated region*) (Whyard, Singh, & Wong, 2009); por el contrario, genes como V-ATPasa pueden tener efecto sobre *B. tabaci*, *D. virgifera virgifera* y *B. dorsalis* (Thakur, Munde, & Upadhyay, 2016). Además, para ampliar el espectro de la estrategia ARNi también se pueden utilizar mezclas de ARNdc dirigidas contra diferentes especies de insectos (Thakur et al., 2016).

La síntesis de las cadenas de ARNdc (sentido y antisentido) se puede realizar por vía enzimática *in vitro*, o pueden ser clonadas de manera independiente en un plásmido bajo el promotor del bacteriófago T7. Los plásmidos se alinean con enzimas de restricción y se transcriben de manera independiente utilizando la ARN polimerasa T7. En cualquiera de los dos casos, las cadenas sencillas de ARN se mezclan en concentraciones equimolares y se añaden por complementariedad para generar el ARNdc (Kontogiannatos et al., 2013). Una

manera de producir ARNdc a mayor escala es mediante la transformación de células de *E. coli* usando una cepa deficiente en ARNasaIII, conocida como HT115 (DE3), así la producción del plásmido que contiene el inserto del gen de interés se produce después de la inducción con IPTG (isopropylthio- β -galactoside), dado que las unidades transcripcionales que generarán el ARNdc están reguladas por el operador y represor Lac (Tenllado, Martínez-García, Vargas, & Díaz-Ruiz, 2003).

Vías de administración del ARNdc

Existen diversas posibilidades para administrar el ARNdc que desencadena el mecanismo de ARNi en el control de insectos. Para efectos de investigación, se ha probado la inyección del ARNdc en el hemocele del insecto, su aplicación en dietas sintéticas o por alimentación en gota; sin embargo, para el desarrollo

de una estrategia de control aplicable a campo, estas metodologías no son factibles (Thakur et al., 2016). Para ello, se han estudiado formas de administración oral bajo diferentes estrategias, como las plantas hospederas transgénicas que expresen moléculas de ARNdc o la aplicación directa de las moléculas (figura 21.2). Por otra parte, se han realizado estudios con virus infectivos (baculovirus recombinantes) que pueden expresar ARNdc. Hajos et al. (1999) describieron el uso del nucleopoliedrovirus de *Autographa californica* (AcMNPV) que expresa ARNdc dirigido contra la hormona juvenil esterasa (JHE) bajo el promotor p10 para el control de *Chloridea (Heliothis) virescens*.

Se han descrito diversas formas posibles para aplicar el ARNdc, incluyendo cebos, aerosoles, sistemas de riego, etc. Las formulaciones permiten proteger las moléculas de ARNdc para prevenir la degradación y aumentar su posibilidad de ingreso en el sistema celular del insecto blanco. Dentro de las estrategias

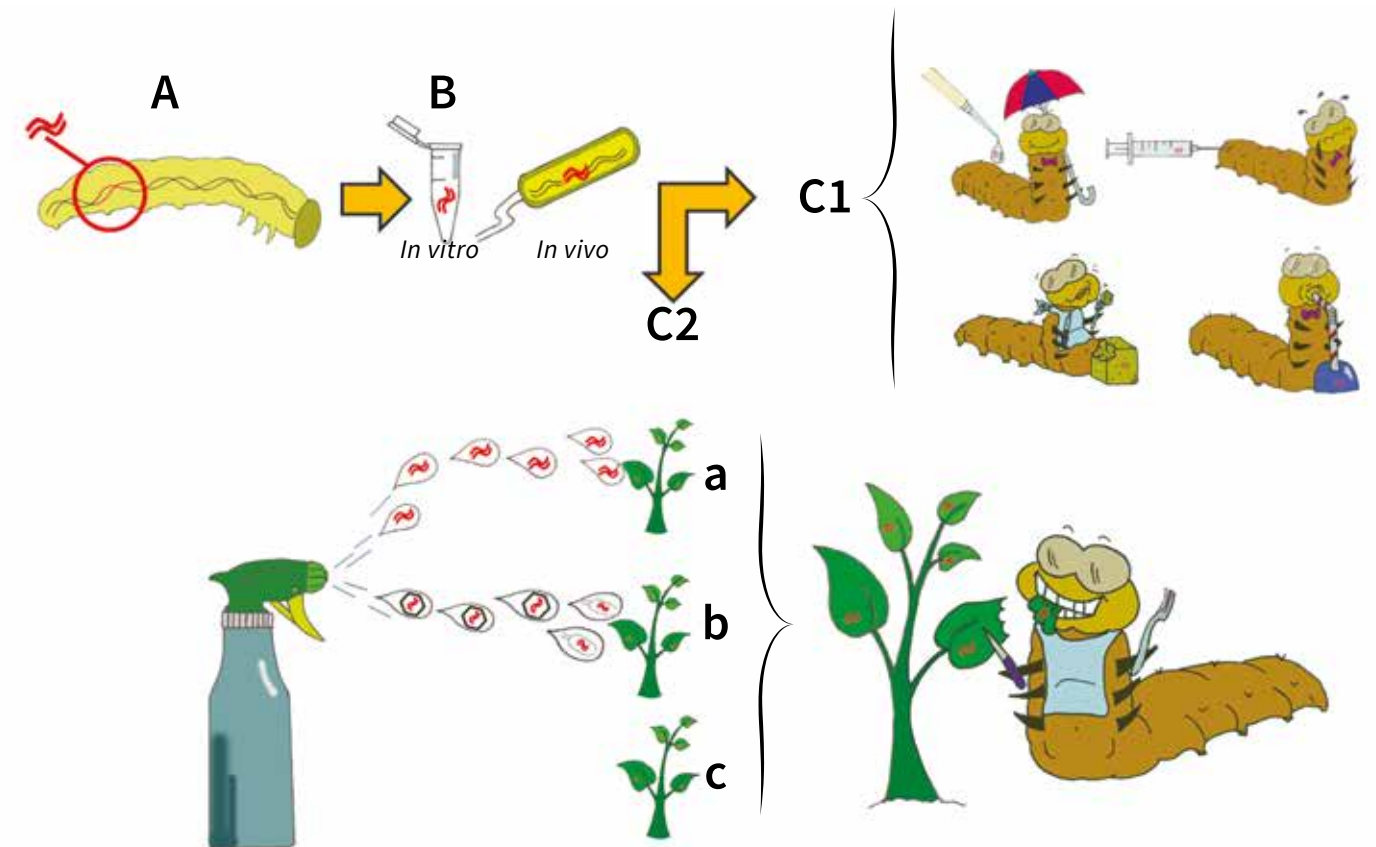


Figura 21.2. Esquema de la estrategia de control de insectos plaga mediante ARNi. A. Selección del gen blanco; B. Producción de moléculas desencadenantes; C. Vías de aplicación; C1. Métodos utilizados en laboratorio: aplicación tópica e inyectada y aplicación oral mediante dietas artificiales y método de la gota; C2. Estrategias de liberación en campo; C2a. Aplicación de moléculas desencadenantes formuladas; C2b. Aplicación a través de vectores (bacterias y virus); C2c. Uso de plantas hospederas transgénicas.

Fuente: Elaboración propia

utilizadas se encuentran: el recubrimiento en liposomas (Whyard et al., 2009) y nanopartículas de quitosán (Zhang, Zhang, & Zhu, 2010) para proteger de condiciones ambientales; también se han usado péptidos denominados CPP (del inglés *cationic cell-penetrating peptides*) que pueden proteger las moléculas de la degradación endosomal y entregar la carga directamente en la célula (Endoh & Ohtsuki, 2009).

Eficacia del control de plagas mediado por ARNi

La eficacia del control mediado por ARNi es variable entre diferentes grupos de insectos, posiblemente por diferentes factores inherentes a la especie en cuestión. A pesar de diversos estudios en diferentes órdenes de insectos como Coleoptera, Hemiptera, Orthoptera, Hymenoptera, Lepidoptera y Diptera, los dos últimos parecen tener menor susceptibilidad al mecanismo ARNi (Thakur et al., 2016).

En algunos casos, existen limitantes como la degradación rápida de las moléculas de ARNdc, ineficientes formas de internalización de las moléculas en la célula o baja presentación y subsecuente interacción con la maquinaria del mecanismo de interferencia. Además, se tienen reportes que demuestran que el pH y las enzimas intestinales pueden degradar el ARNdc antes de internalizarse en las células (Garbutt, Bellés, Richards, & Reynolds, 2013; Hakim, Baldwin, & Smagghe, 2010). En este sentido, se han descrito ejemplos en los que se demuestran las causas de variabilidad en la eficiencia del mecanismo ARNi en diferentes grupos de insectos (Ivashuta et al., 2015; Shukla et al., 2016; Wang et al., 2016).

Uso de metabolitos como potenciadores de la actividad biológica

En Colombia, el uso de agentes de control biológico (ACB) ha venido tomando fuerza en los últimos años debido a la concientización de los agricultores respecto a la aplicación indiscriminada de agroquímicos y sus conse-

Otros factores que determinan el éxito de la estrategia de ARNi incluyen la dosis empleada para la inducción del mecanismo, donde algunos insectos responden a altas dosis y otros pueden ser sobresaturados, lo cual inhibe la maquinaria y la eficiencia del control (Garbutt et al., 2013). Por otra parte, la longitud de las moléculas también puede ser un factor decisivo de éxito y varía entre diferentes especies de insectos (Bolognesi et al., 2012), donde se han descrito fragmentos entre 134 y 1.842 pb, con un rango frecuente entre 300 y 500 pb (Scott et al., 2013).

El ARNdc producido *in vitro* mediante un sistema enzimático o producido de manera recombinante en bacterias transformadas puede ser considerado como un producto natural (bioplaguicida), ya que su mecanismo de acción se presenta de manera natural. Esta tecnología, como la mayoría de los plaguicidas biológicos, puede ser menos efectiva que los plaguicidas químicos; sin embargo, es aplicable en combinación con otras estrategias para evitar el desarrollo de resistencias e inclusive para disminuir el impacto ambiental que puede generar el control químico convencional vía reducción de dosis (Kourti, Swevers, & Kontogiannatos, 2017). Por otra parte, la aplicación de ARNi puede ser utilizada como sinergista para aumentar el efecto de otros bioplaguicidas. Otro factor importante para el desarrollo de ARNi como controlador biológico son los costos de producción, ya sea por vía síntesis enzimática o bacteriana. Para ensayos de laboratorio es posible producir bajas cantidades; sin embargo, la producción a gran escala aún no es viable (Palli, 2014). A pesar de ello, los costos han ido descendiendo rápidamente: mientras en 2008 se estimaba el costo de 40 g de ARNdc en 500.000 dólares, para el 2016 los costos estimados para la misma cantidad fueron de 4.000 dólares (De Andrade & Hunter, 2016).

ciencias para la salud y el medio ambiente, a la aparición de resistencia por parte de las plagas y a las restricciones del mercado internacional frente a los límites de residuos de plaguicidas en los productos de importación.

Numerosos esfuerzos se han realizado por parte de las universidades, las organizaciones científicas y los gremios para desarrollar productos biológicos de alta calidad, que sean rentables para los productores y que tengan igual o mayor eficacia que los agroquímicos. Los productos entomopatógenos más comúnmente empleados tienen como principio activo hongos (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii*, entre otros), bacterias (*Bacillus thuringiensis*) y, minoritariamente, virus (baculovirus). Sin embargo, una de sus grandes limitantes es el tiempo entre su aplicación y la muerte de los insectos, el cual suele ser de varios días, además de requerir, en algunos casos, dosis altas para evidenciar una eficacia aceptable, lo cual puede aumentar los costos.

Gracias al amplio conocimiento que hoy se tiene respecto a estos organismos, es posible mejorar y potenciar su uso mediante el aprovechamiento de sus genes de virulencia y del rol biológico que desempeñan en la patogénesis. Los modos de acción químicos o bioquímicos toman entonces gran importancia en el desarrollo de bioplaguicidas eficaces. La investigación actual y futura sobre bioplaguicidas se beneficiaría de un enfoque intensificado en la química, que tomara en cuenta no solo la acción del microorganismo *per se* sino que integrara una visión holística desde múltiples frentes y mecanismos de acción (Hubbard, Hynes, Erlandson, & Bailey, 2014). Una comprensión más completa de la base química del control biológico de plagas puede facilitar el desarrollo de bioplaguicidas de nueva generación mediante el uso combinado de agentes de control biológico con diferentes metabolitos bioactivos que mejoren las características insecticidas del producto, ya sea disminuyendo su concentración o tiempo letal o ampliando el rango de hospederos sobre los cuales tiene efecto. Dichas estrategias se han investigado, ya sea mediante la manipulación genética de los organismos o como aditivos funcionales (Ortiz-Urquiza, Luo, & Keyhani, 2015).

Los metabolitos bioactivos más ampliamente estudiados han sido las enzimas obtenidas de los hongos entomopatógenos. La penetración de los hongos en la epicutícula de los insectos depende de factores físicos y químicos influenciados por la composición y la maquinaria enzimática de los hongos. Dicha maquinaria incluye la producción de quitinasas, proteasas, lipasas y esterasas, entre otras (Hubbard et al., 2014; Khachatourians, 1996).

Otra estrategia que se ha estudiado es el uso de toxinas específicas para insectos (insectotoxinas). Muchos animales, particularmente las arañas y los escorpiones, han desarrollado neurotoxinas que afectan únicamente el sistema nervioso de sus presas, paralizándolas y luego matándolas. Por tal razón estas moléculas tienen un gran potencial para el control de insectos plaga (Gurevitz et al., 2007; Harrison & Booning, 2001; Rohou, Nield, & Ushkaryov, 2007).

Quitinasas

Las quitinasas son enzimas que han sido detectadas en una gran variedad de organismos, incluyendo los hongos, y que intervienen en la degradación de la quitina presente en el exoesqueleto y en los revestimientos intestinales de los insectos (Zhiqiang, 2005). Debido a la importancia de la quitina y sus enzimas metabólicas en el crecimiento y el desarrollo de los insectos, las enzimas quitinolíticas y sus genes han recibido mucha atención en los últimos años. Este interés se basa en el hecho de que las quitinasas pueden participar como agentes de defensa frente a insectos plaga y patógenos porque degradan estructuras vitales como la membrana peritrófica, la cutícula de los insectos, los huevos, la pared celular de patógenos fúngicos, o por liberación de moléculas que posteriormente provocan otros tipos de respuestas defensivas por parte del hospedero (Herrera-Estrella & Chet, 1999). Tanto los hongos como las bacterias y los virus entomopatógenos poseen genes que codifican para la producción de quitinasas, y se ha demostrado que, en los procesos infectivos, estas perforan la membrana del intestino de los insectos, facilitando la entrada de los patógenos a la cutícula del insecto y permitiendo así la penetración de los hongos (Singh et al., 2014).

Dada la importancia de las quitinasas tanto en el control de insectos como en la resistencia a enfermedades, se han clonado numerosos cDNA de quitinasas provenientes de plantas o de microorganismos y algunos se han introducido en plantas bajo el control de promotores constituyentes, lo cual ha dado como resultado una mejora de la resistencia de la planta a hongos fitopatógenos (Herrera-Estrella & Chet, 1999). En el caso de los insectos existe menos información al respecto, con muy pocos casos de éxito

reportados. Osman et al. (2015) aislaron un gen de quitinasa proveniente del insecto *Spodoptera littoralis* y desarrollaron plantas de maíz que expresaban esta enzima. Los bioensayos realizados revelaron que se presentó más de un 60 % de mortalidad de larvas de *Sesamia cretica* cuando estas fueron alimentadas en el maíz transgénico. Esta estrategia, sin embargo, debe estudiarse más a fondo. Es por esto que el estudio del uso combinado de entomopatógenos y quitinasa surge como una estrategia innovadora para el desarrollo de bioplaguicidas.

Quitinasas como sinergistas de microorganismos: caso *Bacillus thuringiensis* (Bt)

Las quitinasas microbianas se han utilizado en experimentos de mezclas para aumentar la potencia de microorganismos entomopatógenos. Dichos efectos sinérgicos se describieron desde los años setenta, en donde se usaron enzimas quitinolíticas bacterianas para potenciar la actividad de la bacteria *B. thuringiensis* (Kramer & Muthukrishnan, 1997). Se observó un efecto letal mayor sobre larvas de *S. littoralis* cuando se incorporó una combinación de bajas concentraciones de una toxina Bt recombinante (Cry1C) y una endoquitinasa de *Serratia marcescens* en la dieta de los insectos (Regev et al., 1996). La mezcla de una cepa de Bt con baja actividad quitinolítica con cepas de Bt con alta producción de quitinasas resultó en una menor concentración letal media que la cepa inicial sobre larvas de *Spodoptera exigua* (Liu et al., 2002). En otro estudio, se purificó una quitinasa a partir del sobrenadante del medio de cultivo de la cepa de Bt HD-1. Dicha proteína potenció el efecto insecticida de la proteína Vip cuando se utilizó contra larvas neonatas de *Spodoptera litura* y redujo su concentración letal en un 30 % (Arora, Ahmad, Rajagopal, & Bhatnagar, 2003). Incluso se modificó genéticamente una cepa de Bt nativa a la que se le incluyó un gen que codifica para la quitinasa chiBIA de *Bacillus licheniformis* por recombinación homóloga y se demostró que se redujo más del 50 % la concentración letal 90 de la cepa Bt sobre larvas de *S. exigua*. Además, utilizando microscopía electrónica de barrido, se observaron perforaciones en la membrana peritrófica de larvas que

fueron alimentadas con quitinasas crudas o purificadas desde el primer instar (Thamthiankul, Moar, Miller, & Panbangred, 2004). Los estudios descritos demuestran el potencial de emplear agentes entomopatógenos en mezcla con enzimas involucradas en la virulencia de dichos microorganismos.

Proteínas derivadas de baculovirus

Como se mencionó, los baculovirus producen gran cantidad de proteínas involucradas en su patogenicidad y virulencia, muchas de las cuales se encuentran expuestas en el cuerpo de inclusión y mejoran la eficiencia del proceso de infección. Dichas proteínas se han empleado durante más de veinte años para mejorar el efecto insecticida de los baculovirus mediante su modificación genética, y se ha logrado disminuir su tiempo o su concentración letal; sin embargo, la seguridad de estos virus recombinantes debe ser investigada más a fondo. Además, se deben tener en cuenta las restricciones legales que existen en varios países para el uso de organismos genéticamente modificados (Ravensberg, 2011). En este contexto resulta más interesante sacar provecho de la adición de estas proteínas a los bioplaguicidas, ya sea que estén producidas por otros organismos o como proteínas derivadas de los cuerpos de inclusión virales.

Un ejemplo de esto es el uso combinado de las proteínas del granulovirus de *Xestia c-nigrum* (XecnGV), cuyo análisis genético demostró que posee cuatro proteínas enhancinas y otras proteasas importantes (Hayakawa et al., 1999) como potenciadores de la actividad del nucleopoliedrovirus de *Mamestra configurata* (MacoNPV). Las enhancinas causan degradación de la mucina, el principal componente de la membrana peritrófica, lo cual permite un mayor acceso de los viriones a las células epiteliales del intestino medio y da como resultado una mayor susceptibilidad del insecto a la infección viral (Biedma, Salvador, Ferrelli, Sciocco-Cap, & Romanowski, 2015). Se emplearon las proteínas alcalinas solubles de XecnGV junto con MacoNPV en ensayos de campo sobre cultivos de repollo durante dos años y se confirmó el efecto potenciador de las proteínas solubles de gv sobre la infección de nucleopoliedrovirus y sobre la potencia de las formulaciones, que contenían

10^5 cuerpos de inclusión/mL de NPV y 5 µg/mL de proteínas de gv para el control de larvas de *Mamestra brassicae* (Goto, Mukawa, & Mitsunaga, 2015). Aun así, es necesario explorar la posibilidad de desarrollar cepas virales recombinantes que contengan las proteínas potenciadoras o sinérgicas dentro de su genoma, mediante métodos que garanticen su estabilidad y seguridad.

Toxinas

Las toxinas provenientes de los arácnidos (principalmente escorpiones) han sido ampliamente estudiadas en este contexto, ya que contienen moléculas que actúan específicamente sobre los insectos, los paraliza o los matan (con dosis altas) y no tienen efectos en los mamíferos (Gurevitz et al., 2007; Ortiz & Possani, 2015; Rohou et al., 2007). Un grupo de toxinas de escorpión denominadas β -NaScTx se acoplan al sitio 4 de los canales de sodio de las neuronas motoras y provocan su activación prematura, causando espasmos musculares y parálisis (Pelhate & Zlotkin, 1982). También se ha demostrado que esta familia de toxinas, en altas concentraciones, no afecta las neuronas de los mamíferos (De Dianous, Hoarau, & Rochat, 1987). Gracias a la especificidad de dichas toxinas por los canales de sodio de los insectos, estas moléculas han sido propuestas como alternativa para el control de insectos plaga. Sin embargo, la gran limitante en su implementación ha sido la forma de aplicación. Las arañas y los escorpiones inyectan sus toxinas directamente en los insectos y estas se diseminan rápidamente a través de la hemolinfa. No se observa penetración a través de la cutícula de los insectos o mediante la ingestión, lo cual limita su aplicación directa sobre los cultivos (Ortiz & Possani, 2015).

Una solución potencial es utilizar entomopatógenos que faciliten el paso de las toxinas del tracto digestivo a la hemolinfa. En la década de los noventa se realizaron estudios sobre la modificación genética de baculovirus para que expresen toxinas de arañas (Kiyatkin, Kulikovskaya, Grishin, Beadle, & King, 1995; Rohou et al., 2007) o β -toxinas de escorpiones, ya que se estaban comenzando a utilizar como método de control de plagas (Maeda et al., 1991). El baculovirus modificado de *Autographa californica* con la toxina del escorpión *Androctonus australis* incrementó la

velocidad de mortalidad de larvas entre un 10 y un 15 % aproximadamente y, además, gracias al efecto paralítico de las toxinas, el área foliar consumida por las larvas se redujo cerca del 25 % (Cory et al., 1994). Similarmente, el nucleopoliedrovirus de *Helicoverpa armigera* modificado con la misma toxina redujo su tiempo letal entre un 17 y un 34 %, y el tiempo en que las larvas se alimentaron, entre el 30 y el 43 % (Sun et al., 2004). De la misma forma, se han desarrollado cepas de *Metarhizium acridum* con dos toxinas de escorpión diferentes y en ambos casos se observó un incremento en la velocidad de crecimiento de micelio en la hemolinfa y una reducción en el tiempo letal de aproximadamente el 30 % en *Locusta migratoria* (Peng & Xia, 2014; 2015). Paralelamente se observó que se necesita un 45 % menos de esporas de *M. anisopliae* modificado con β -NaScTx para lograr la concentración letal 50 en mosquitos vectores de malaria (Bilgo et al., 2017). Sin embargo, debido a la baja aceptación de los microorganismos modificados genéticamente, se ha detenido el desarrollo de esta tecnología. No obstante, los cambios en la opinión pública y la legislación, en el futuro, podrían revivir su continuidad.

Como alternativa a la modificación genética de los baculovirus, las toxinas también se pueden utilizar como aditivos en las formulaciones. Las toxinas de arañas y escorpiones recombinantes se han ligado a proteínas transportadoras como la lignina GNA (*Galanthus nivalis* agglutinin). Al ligar la neurotoxina de la araña *Segestria florentina* con GNA se observó una mortalidad en el saltahoja del arroz, *Nilaparvata lugens*, del 100 % después de siete días, y un incremento del 50 % en la mortalidad del áfido *Myzus persicae* en comparación con el control (Down et al., 2006). La fusión de GNA con la toxina del escorpión *Mesobuthus tamulus* mostró una alta mortalidad (entre el 70 y el 90 %) en la polilla del tomate *Lacanobia oleracea* (Trung, Fitches, & Gatehouse, 2006). Aunque se ha visto que este método no es específico y puede afectar diferentes órdenes de insectos, se ha observado que en larvas de *L. oleracea* inyectadas con estas proteínas de fusión a una dosis subletal no se ve afectado el desarrollo del parasitoide *Eulophus pennicornis*, lo cual sugiere que puede ser un método complementario en programas de manejo integrado de plagas (Nakasu et al., 2016). Sin embargo, es necesario que se evalúe su efecto sobre enemigos naturales depredadores.

De momento no se han evaluado mezclas de baculovirus con las combinaciones de GNA y toxinas (GNA/Tx) y aún quedan muchos interrogantes por resolver. En primer lugar, hay que determinar qué cantidad de GNA/Tx es suficiente para potencializar el efecto de los baculovirus para que estos se puedan usar de forma correctiva. Esta cantidad va a definir si el producto es viable económicamente o si es más efectivo usar únicamente el GNA/Tx. Otra alternativa es evaluar únicamente las toxinas como aditivo para potenciar los baculovirus. Dado que los baculovirus abren poros en la membrana peritritrónica, es posible que los orificios sean suficientes para que las toxinas lleguen a la hemolinfa.

Los metabolitos bioactivos producidos por los diferentes organismos tienen un alto potencial para ser em-

pleados como potenciadores de la actividad insecticida de microorganismos entomopatógenos, enfocados a mejorar diferentes características de los bioplaguicidas que se emplean tradicionalmente en los sistemas productivos. Dada la poca aceptación de emplear organismos genéticamente modificados, una opción viable es la producción de estos metabolitos en sistemas de bio-fábricas y su inclusión aditiva en las formulaciones, con resultados interesantes demostrados en laboratorio y, en algunos casos, en campo.

Muchos de estos logros se derivan de una mayor comprensión de la biología de estos organismos y de la inversión en este tipo de investigaciones que se orientan al empleo racional y seguro de entomopatógenos como agentes de control de insectos.

Combinación de microorganismos en el control de insectos plaga

La interacción patógeno-hospedero se limita en la mayoría de los casos al estudio de una sola especie de patógeno, sin embargo, se ha venido conociendo que en la naturaleza las infecciones múltiples son mucho más comunes de lo que se suponía. Se pueden dar naturalmente infecciones en las que dos o más agentes infecciosos coexisten en el mismo hospedero y pueden ser de linajes muy diferentes, incluso genéticamente, pero pertenecientes a una misma especie. En el caso de infecciones mixtas, pueden darse interacciones complejas entre los patógenos involucrados, se puede aumentar o suprimir la capacidad virulenta de ambos agentes infectivos o puede elevarse la capacidad de uno y disminuirse la del otro. En último caso, los agentes están compitiendo por un recurso, que es el hospedero, o, más aún, podrían competir por una parte específica del recurso (hemolinfa, cuerpos grasos, tejidos o células determinadas).

Hongos entomopatógenos con otros microorganismos

Dentro de las estrategias de control biológico se puede incluir el uso de agentes biológicos de manera

combinada, dentro de las cuales es posible evidenciar eventos de sinergismo o capacidad aditiva en su toxicidad. Tal es el caso de un estudio realizado por Torres & Cotes (1999), en el cual, al evaluar un aislamiento del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* y otro de *Metarhizium anisopliae* contra el gusano blanco de la papa *Premnotrypes vorax*, encontraron un incremento en el porcentaje de eficacia al usarlos de manera combinada con respecto a su aplicación individual. La combinación de los aislamientos se hizo ajustándolos a su concentración letal media (CL_{50}), la cual fue de 55×10^5 conidios mL^{-1} para *B. bassiana*, y para *M. anisopliae* de 13×10^5 conidios mL^{-1} . Se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de eficacia alcanzados para el día 10 por dichos tratamientos, incluyendo los obtenidos por los testigos absoluto y tratado (tratamiento de los insectos con Tween 80 al 0,1 %). Al evaluar la actividad biocontroladora de manera combinada sobre adultos de *P. vorax*, se encontró un porcentaje de eficacia del 25 % al día siguiente de inoculados. Este porcentaje aumentó rápidamente hasta alcanzar una eficacia del 51,84 % y del 100 % para el día cuarto y décimo respectivamente. En contraste, cuando se evaluaron los aislamientos de manera individual, se observó, al siguiente día de haber inoculado los insectos, una

eficacia del 3,7 % y del 14,29 % para *B. bassiana* y *M. anisopliae* respectivamente. Sin embargo, aunque estos porcentajes aumentaron gradualmente, no fue posible alcanzar el 50 % de eficacia al décimo día.

La disminución en el tiempo de la mortalidad de los insectos tratados con la mezcla de los aislamientos con respecto a su utilización individual podría relacionarse con un efecto sinérgico de mecanismos de acción de cada microorganismo. Estos resultados podrían explicarse, en parte, por la acción combinada de las toxinas de *B. bassiana* y de *M. anisopliae* a la que se sometieron los insectos.

En procesos de control biológico con *Metarhizium* spp., normalmente se lleva a cabo una síntesis de diferentes péptidos cíclicos de variada composición amino e hidroxiamino, como es el caso de las destruxinas producidas por *M. anisopliae*, toxinas que, según Poprawski, Robert y Maniana (1985), pueden variar en su acción sobre el hospedero. Tal es el caso de la destruxina E, que puede actuar en el momento de la infección con un efecto tóxico caracterizado por producir en el insecto flacidez y parálisis del cuerpo. Además, el aislamiento de *B. bassiana* podría haber sintetizado los compuestos denominados beauvericina, beauveroliodes y bassionalidae, los cuales están asociados con la actividad insecticida del hongo (Gillespie & Claydon, 1989).

Este evento de sinergismo en la toxicidad se apoya en el hecho de haber obtenido al día siguiente de la inoculación de los adultos con la mezcla una eficacia del 25 %, mientras que, en este mismo día, al utilizarlas de manera individual, se obtuvieron eficacias del 3,57 % y del 14,29 % respectivamente para *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Teniendo en cuenta estos resultados, el más rápido efecto de mortalidad podría atribuirse a la actividad de *M. anisopliae*. Además, la actividad de este hongo podría haber sensibilizado los insectos a otros mecanismos de acción correspondientes a *B. bassiana* o a *M. anisopliae* que involucran procesos mecánicos y enzimáticos (Khachatourians, 1991). Después del contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto, se da una síntesis de enzimas con efecto específico sobre cada uno de los componentes de la epicutícula y la cutícula. La primera es desintegrada por la acción de las lipasas y la segunda por las quitinasas, N-acetil- β -glucosaminidasas y proteasas

(Clarkson & Charnley, 1996). Dentro de estas enzimas, la serina proteasa de *M. anisopliae* presenta dos actividades, Pr1 y Pr2, responsables de la hidrólisis del 25 % al 30 % de las proteínas cuticulares que son secretadas por el apresorio y por la hifa, que penetra la cutícula, así como también de la separación física de capas (Khachatourians, 1991). Estas enzimas de *M. anisopliae* podrían haber causado rompimiento de la cutícula del insecto, facilitando así la penetración de *B. bassiana*. Los resultados demostraron que, al utilizarse de forma combinada, puede existir una interacción que potencializa la actividad biocontroladora de los aislamientos de *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Esta interacción puede darse desde muchas estrategias: sinergismo, adición, mutualismo o sintrofia. En el caso de mutualismo, los microorganismos superan algún factor limitante en el medio, lo cual facilita su desarrollo, mientras que en el caso de sintrofia los microorganismos podrían compartir el microambiente, pues el metabolismo de uno sería accesible al otro (Campbell, 1987).

Como se mencionó al principio de este apartado, la acción combinada de los microorganismos no siempre repercute en el aumento de la mortalidad. Tal es el caso de un trabajo hecho por Uma Maheswara Rao, Uma Devi y Akbar Ali Khan (2006) en el que sometieron larvas de segundo instar de *Spodoptera litura* a la aplicación conjunta de *Metarhizium rileyi* (antes *Nomuraea rileyi*) y *B. bassiana* en dos niveles de temperatura, una constante (25 °C) y una variable (32 °C/8 horas y 21 °C/16 horas); como resultado, los dos hongos no tuvieron efecto sinérgico sobre la mortalidad de los insectos.

Sin embargo, se han encontrado efectos sinérgicos o aditivos entre patógenos de otros grupos sistemáticos, por ejemplo, se han observado efectos durante la infección fúngica combinada de *Metarhizium* y *Beauveria* y bacterias como *Bacillus thuringiensis* y *Pseudomonas* (Yaroslavtseva et al., 2017). Por ejemplo, Mwamburi, Laing y Miller (2009) encontraron una reducción del 52 % de emergencia de adultos de *Musca domestica* cuando aplicaron a las larvas en el agua 500 mg/kg de la combinación de *B. thuringiensis* var. *israelensis* y un aislamiento de *B. bassiana*. Contra el barrenador asiático del maíz *Ostrinia furnacalis* se ha evaluado en laboratorio la combinación de la toxina Cry1Ac de *B. thuringiensis* y *B. bassiana*,

y se encontraron efectos aditivos sobre larvas de tercer instar (Ma et al., 2008). Lednev et al. (2008) aplicaron una combinación de *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Pseudomonas* spp. sobre *Locusta migratoria*, y como resultado la mortalidad aumentó y el tiempo letal disminuyó. Para el manejo de la polilla *Sesamia nonagrioides* se han evaluado combinaciones de *B. thuringiensis* con *M. anisopliae* y *B. thuringiensis* con *B. bassiana* y se obtuvieron efectos aditivos y mortalidad entre el 60 al 100 % (Mantzoukas, Milonas, Kontodimas, & Angelopoulos, 2013). De igual manera, con la combinación de un aislamiento de *B. bassiana* y de *B. thuringiensis* sobre larvas de segundo y cuarto instar de *Earias vittella* se encontró un aumento en la mortalidad y una tasa menor de formación de pupas, de adultos y de eclosión de huevos (Ali, Wakil, Zia, & Sahi, 2015). Wraight y Ramos (2005) determinaron la eficacia en parcelas de campo de una mezcla de *B. thuringiensis* y *B. bassiana* sobre poblaciones larvales de *Leptinotarsa decemlineata*, y obtuvieron una reducción en la población de hasta un 35 %. Por último, Yaroslavtseva et al. (2017) realizaron ensayos biológicos combinando *Metarhizium robertsii* (7×10^5 conidios mL⁻¹) con un aislamiento de *B. thuringiensis* ssp. *morrisoni* var. *thuringiensis* (2×10^6 cristales y esporas mL⁻¹) sobre larvas de cuarto instar de *L. decemlineata*. Encontraron una reducción en el tiempo letal (tres días) en comparación con el hongo (ocho días) y la bacteria, la cual fue igual al testigo. Se concluyó que hubo un efecto sinérgico en comparación con la aplicación individual de cada microorganismo.

Los mismos autores le atribuyeron a la bacteria un cambio de la reacción inmunofisiológica del insecto que permite el incremento de la susceptibilidad a la infección fúngica. La bacteria mejora la actividad fenoloxidasas, inhibiendo la inmunidad celular e interrumpiendo la respuesta del sistema detoxificativo a la acción del hongo.

En cuanto a la combinación con virus entomopatógenos, hay muy pocos estudios desarrollados. Lecuona y Alves (1988) encontraron efectos en laboratorio al mezclar *B. bassiana*, *Beauveria brongniartii* con el virus de la granulosis de *Diatraea saccharalis* (DsGV). Los autores registraron una mejoría en la eficacia de los hongos, pero sin que se modificara la del virus. Por otro lado, Pauli (2009) mezcló en laboratorio un aislamiento de *M. anisopliae*, uno de *B. bassiana* y

DsGV y encontró un efecto aditivo en la mezcla con *M. anisopliae*, CL₅₀ fue de $1,97 \times 10^7$ CI mL⁻¹, aunque se puede considerar una concentración letal algo alta. Con *B. bassiana*, se encontró un efecto antagonista.

Coinfecciones virales: virus - virus

El uso de virus entomopatógenos se ha enfocado principalmente en el desarrollo de estrategias de control biológico mediante el uso individual de aislamientos virales para el control de insectos de importancia agrícola o de importancia en salud humana; sin embargo, en diferentes estudios se han evidenciado interacciones virus-virus que pueden determinar cambios en el desarrollo de la infección. Aunque la mayoría de estas interacciones han sido descubiertas por casualidad y son el resultado de procesos evolutivos por la característica propia de los virus como parásitos obligados, existen algunos casos en donde las combinaciones dirigidas entre virus entomopatógenos han mostrado tener un efecto significativo en la patogénesis viral (Cuartas & Villamizar, 2011). Este cambio en la patogénesis puede darse por interacciones directas de genes virales o producto de los genes, interacciones indirectas que modifican las condiciones del hospedero o interacciones que perturban el sistema inmune de los insectos (DaPalma, Doonan, Trager, & Kasman, 2010).

Las diferencias medibles en las combinaciones virales incluyen cambios en el tropismo celular, en los procesos de replicación viral, producción y liberación de progenie, latencia y patología de la infección por cambios a nivel del sistema inmune (Waner, 1994), lo que conlleva a un aumento de la tasa de replicación y de la patología viral en comparación con infecciones individuales (Kasman, 2010). Aunque en la actualidad existen más de quince familias virales que afectan insectos (International Committee on Taxonomy of Viruses [ICTV], 2016), solo en las familias Ascoviridae, Baculoviridae, Metaviridae, Polydnviridae, Poxviridae y Reoviridae se han evidenciado este tipo de interacciones (Cuartas & Villamizar, 2011). A continuación, se exponen algunos ejemplos.

Interacciones directas

Las interacciones directas se caracterizan porque ocurre una interacción física directa entre el producto de los genes de dos virus distintos (DaPalma et al., 2010), lo cual da como resultado virus ayuda-dependientes (*helper-dependent viruses*), cuya replicación o proceso de infección es defectivo por sí solo y requiere del producto de los genes de otros virus para producir una progenie infecciosa, recombinaciones genómicas que se producen naturalmente en la evolución viral como un mecanismo genético, que contribuye a la heterogeneidad del genoma y a su plasticidad, y virus incrustados (*embedded viruses*), como es el caso de los retrovirus, que se integran en el genoma de un virus ADN grande no relacionado (Cuartas & Villamizar, 2011; DaPalma et al., 2010; Jehle, Fritsch, Huber, & Backhaus, 2003). Este tipo de interacción requiere que la coinfección viral se desarrolle en una misma célula, pero no necesariamente que la infección ocurra al mismo tiempo (DaPalma et al., 2010).

Para el caso de los virus ayuda-dependientes, un ejemplo de este proceso se presenta cuando un aislamiento viral que no tiene la capacidad de replicarse en cierta línea celular se combina con un aislamiento que sí se puede replicar, dando como resultado una disminución en la producción de partículas virales del segundo virus y una alta producción de partículas virales del primero, posiblemente por la activación de factores de transcripción y traducción y por la elución de los mecanismos de defensa del hospedero (López-Ferber, Simón, Williams, & Caballero, 2003). Este efecto se ha evidenciado en la combinación entre el MNPV de *Lymantria dispar* (LdMNPV) y el MNPV de *Autographa californica* (AcMNPV) en la línea celular Ld652Y (Guzo, Rathburn, Guthrie, & Dougherty, 1992; McClintock & Dougherty, 1987), entre AcMNPV y el MNPV de *Spodoptera exigua* (SeMNPV) en las líneas celulares Sf21 de *Spodoptera frugiperda* y High 5 de *Trichoplusia ni* (Cheng & Lynn, 2009; Yanase, Yasunaga, Hara, & Kawarabata, 1998) y en la coinfección entre AcMNPV y el MNPV de *Thysanoplusia orichalcea* (ThorMNPV) en la línea celular Sf21 (Wang, Salem, Lynn, & Cheng, 2008). Otro ejemplo se presenta en la coinfección entre genotipos defectivos y genotipos completos como el MNPV de *Choristoneura fumiferana* y de *S. frugiperda*,

cuyos genotipos defectivos no infectan por vía oral al carecer de los genes *pif* (gen de infectividad *per os*). La coinfección entre estos genotipos permite que los genotipos defectivos atraviesen el intestino medio y entren al hemocele de la larva para replicarse en otros tejidos (Lauzon, Jamieson, Krell, & Arif, 2005).

En cuanto a las recombinaciones genómicas, un ejemplo de esta interacción se presenta entre el NPV de *Bombyx mori* (BmNPV) y el AcMNPV, donde se ha evidenciado aproximadamente un 90 % de homología entre el material genético; sin embargo, el AcMNPV se replica muy bien en líneas celulares de *T. ni* y de *S. frugiperda* en las cuales el BmNPV no es capaz de replicarse y, por el contrario, en la línea celular desarrollada para *B. mori* se puede replicar, pero debido a la ausencia de transcripción de genes tardíos de proteínas estructurales no tiene la capacidad de producir viriones brotados (Rahman & Gopinathan, 2003). En la línea celular de *B. mori*, la coinfección entre BmNPV y AcMNPV conlleva a la producción de virus recombinantes que presentan alta variación entre los patrones de los parentales, debidos a procesos de recombinación genética y a que tienen la capacidad de crecer en esta línea celular donde antes no lo podían hacer (Kondo & Maeda, 1991; Rahman & Gopinathan, 2003).

En el caso de los virus incrustados, este tipo de interacción solo ocurre con los retrovirus que tras un proceso de coinfección se integran al genoma de un virus ADN grande no relacionado, como en el caso de los baculovirus. Este efecto se ha evidenciado entre el retrovirus *T. ni* y AcMNPV, donde el retrovirus se integra al genoma del NPV durante la replicación viral y adquiere una vía diferente para su entrada y transmisión dentro del hospedero, debido a la alteración de los genes de AcMNPV por la expresión de los genes del retrovirus (Friesen & Nissen, 1990).

Interacciones indirectas

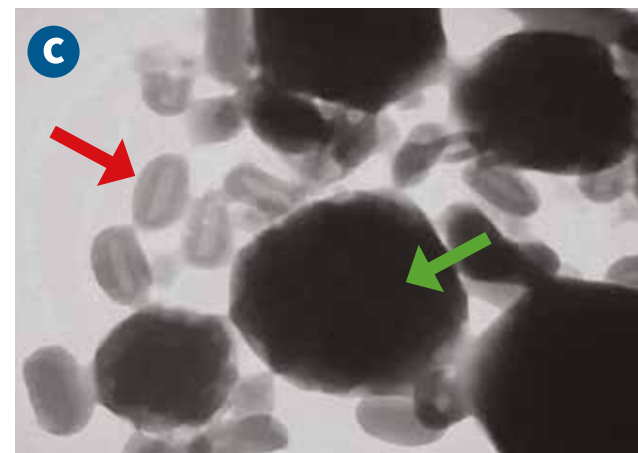
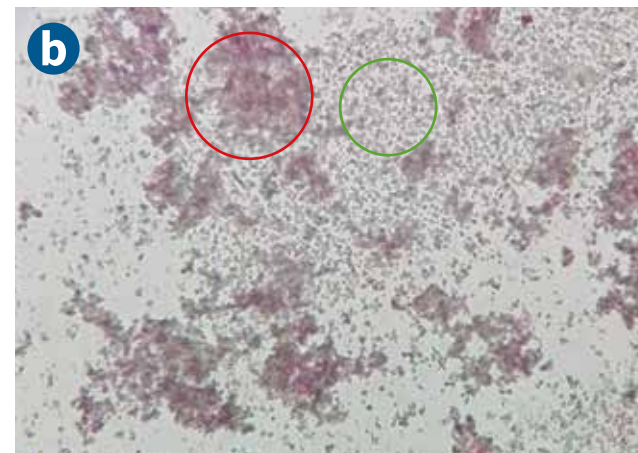
Las interacciones indirectas se presentan cuando ocurre una alteración del medio ambiente del hospedero debido a una coinfección previa o simultánea de dos virus diferentes que originan cambios en la susceptibilidad del hospedero por alteración de las barreras físicas de protección o cambios en la actividad

biológica por factores de potenciación que inducen cambios citopáticos, disminuyendo los valores de las concentraciones letales y de los tiempos de mortalidad (DaPalma et al., 2010).

Para este caso, en muchos aislamientos de baculovirus (la mayoría, granulovirus) se han encontrado genes auxiliares que codifican para proteínas como enhancinas y quitinasas que pueden alterar la estructura de la principal barrera de defensa de los insectos que corresponde a la membrana peritrófica (MP) y ejercen una actividad potenciadora cuando son mezclados con nucleopoliedrovirus. Estas proteínas actúan digiriendo las proteínas de la MP de los insectos infectados, alterando así la integridad estructural e incrementando su permeabilidad, lo que permite un ingreso más rápido de las partículas virales a las células y favorece el proceso de infección (Granados, Fu, Corsaro, & Hughes, 2001; Hoover, Humphries, Gendron, & Slavicek, 2010; Rao et al., 2004; Shapiro, Preisler, & Robertson, 1987; Slavicek, 2012).

En este sentido, se han descrito diferentes combinaciones virales entre GV y NPV que mejoran la patogenicidad viral (figura 21.3). Por ejemplo, la mezcla entre un GV y un NPV de *Spodoptera litura* presenta una potencia relativa de 6,5 con respecto a la patogenicidad del NPV solo (Guo, Fang, Wang, Zhong, & Liu, 2007); la coinfección de un GV y un NPV de *S. exigua* y de un GV de *Xestia c-nigrum* y un NPV de *Mamestra brassicae* presenta una potencia relativa de 10 con respecto a la CL_{50} de los NPV solos (Hayakawa et al., 2000; Mukawa & Goto, 2010); la coinfección entre un GV de *S. frugiperda* y un NPV de *L. dispar* hace que la mezcla sea 13 veces más patógena que el NPV de manera individual (Shapiro, 2000) y la coinfección entre baculovirus colombianos de *S. frugiperda* (VG008+NPV003) presentó un aumento en la patogenicidad de 9,9 veces, con una CL_{50} de $1,7 \times 10^4$ CI/ml, en comparación con $1,7 \times 10^5$ CI/ml cuando se usó el NPV de manera individual (Cuartas, 2014).

En cuanto a la virulencia, el menor tiempo medio de mortalidad (TMM) se ha encontrado con la mezcla entre un GV (VG008) y un NPV (NPV003) colombiano de *S. frugiperda* con una reducción de entre 72 y 96 horas con respecto al NPV individual (Cuartas, 2014). Además, en las mezclas entre el GV de *T. ni* y un npv de *A. gemmatilis*, el GV de *X. c-nigrum* y el NPV de



Fotos: Carlos Espinel y Gloria Patricia Barrera

Figura 21.3. Efecto de la combinación de un nucleopoliedrovirus y un granulovirus sobre *Spodoptera frugiperda*. a. Larva desintegrada por la acción combinada de NPV y GV; b. Imagen de microscopía óptica de purificado viral con azul de toluidina a partir de larva muerta con sintomatología de la infección; se observa la presencia de típicas estructuras de poliedros (círculo verde) e imágenes sugestivas de presencia de granulovirus (círculo rojo); c. Imagen de microscopía electrónica de transmisión de purificado viral con tinción negativa (A. fosfotúngstico) donde se observa la estructura típica de granulovirus (flecha roja) y nucleopoliedrovirus (flecha verde).

M. brassicae y la coinfección entre el GV de *H. armigera* y el NPV de *L. dispar*, han presentado reducciones del TMM de 2,48 y 55 horas respectivamente (Corsaro, Gijzen, Wang & Granados, 1993; Hoover et al., 2010; Mukawa & Goto, 2007; Shapiro, 2000).

En relación con las combinaciones virales que inducen cambios citopáticos (bioquímicos, moleculares, morfológicos, etc.) en las células del hospedero, se ha evidenciado que durante la coinfección entre un NPV de *Pseudaletia unipuncta* (PsunMNPV) y un entomopoxvirus de *Pseudaletia separata* (PsEV) ocurre una potenciación en el ingreso del NPV a las células epiteliales del intestino medio por un aumento en la fusión con las microvellosidades de la membrana debido a la presencia de un factor de potenciación (EF) viral de PsEV, posiblemente codificado por el gen *fusolin* (Hukuhara & Wijonarko, 2001). Asimismo, en la coinfección entre el granulovirus de *P. unipuncta* (PsunGV) y el PsEV, debido a la presencia de factores de potenciación de los dos virus, se observó un aumento en la patogenicidad viral (Hukuhara, Wijonarko, Hosokawa, & Iwano, 2003).

Alteración del sistema inmune

En los insectos, el sistema inmune corresponde únicamente a respuestas innatas conformadas por diferentes mecanismos, como barreras físicas (membrana peritrófica y tegumento), inmunidad celular (reconocimiento de células infectadas, encapsulación y apoptosis) e inmunidad humoral (hemolinas, lectinas, ercosanoides y fenoloxidasas), que generan una protección inespecífica contra diferentes patógenos como bacterias, virus, nematodos, hongos, etc., pero que, en algunos casos, son evadidas de forma exitosa y permiten el desarrollo de la infección (Sparks, Bartholomay, & Bonning, 2008).

En este sentido, se ha observado que mediante la coinfección entre un MNPV de *S. litura* (SpltMNPV) y un polydnavirus asociado a la avispa parasitoide *Microplitis bicoloratus* (MbPDV) se interrumpen los procesos apoptóticos de respuesta inmune del hospedero, posiblemente por la presencia de la proteína P49 presente en el NPV que tiene la función de bloquear la cascada de apoptosis al actuar sobre la caspasa efectora 3 (Luo & Pang, 2006).

Otro ejemplo de una infección mixta que puede llevar a la alteración de este mecanismo de protección se da entre un polydnavirus de *Cotesia congregata* y el AcMNPV en larvas de *Manduca sexta*, en donde se observa un aumento en la susceptibilidad del insecto a la infección, que se refleja en un menor tiempo de mortalidad; esto se debe a que el polydnavirus suprime la respuesta inmune del hospedero que evita la encapsulación de las células infectadas (Washburn, Haas-Stapleton, Tan, Beckage, & Volkman, 2000).

Además, se ha descrito que el AcMNPV puede producir proteínas capaces de bloquear la apoptosis en hospederos permisivos, como las IAP (inhibidores de apoptosis) (Schultz & Friesen, 2009; Zoog, Schiller, Wetter, Chejanovsky, & Friesen, 2002). En este sentido, cuando el AcMNPV infecta células de hospederos no permisivos, como las CF-203 de *Choristoneura fumiferana*, se desencadena la cascada de apoptosis como sistema de defensa; sin embargo, cuando coinfecta simultáneamente este hospedero con el MNPV de *C. fumiferana* (CfMNPV), se disminuyen los niveles de muerte celular hasta en un 99% y se detecta la síntesis de la proteína P35 y otras proteínas IAP (Palli et al., 1996).

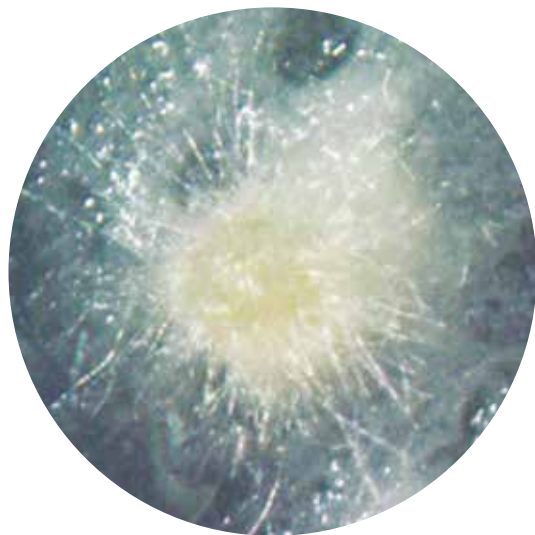
Perspectivas en el uso de coinfecciones virales

Este tipo de estudios acerca de las interacciones entre virus entomopatógenos posibilitan la generación de nuevas estrategias de control de plagas que se pueden combinar dentro de un programa de manejo integrado (Cuartas & Villamizar, 2011). Una primera aproximación se podría generar para ampliar el rango de hospederos mediante virus-ayuda dependientes con la capacidad de potenciar los procesos infectivos a través de sus genes o de sus proteínas transactivadoras, o también mediante la supresión del sistema inmune del hospedero por la interacción con virus capaces de bloquear esta respuesta.

En segundo lugar, para el desarrollo de formulaciones exitosas de agentes microbiales para el control de insectos plaga se podría realizar la potenciación biológica de aislamientos virales por mecanismos de

bloqueo en la respuesta inmune del hospedero o por mecanismos que permitan una entrada y diseminación rápida a las células blanco. Así, para dos grupos de virus entomopatógenos importantes como los baculovirus y los entomopoxvirus se han descrito proteínas como las enhancinas, las quitinasas y las fusolinas que potencian la entrada de las partículas infectivas a las células blanco y la fusión de las partículas virales a las células, lo cual disminuye el tiempo de entrada y de diseminación de los virus dentro del hospedero (Granados et al., 2001; Hukuhara & Wijonarko, 2001). Una tercera estrategia se podría enfocar en mejorar el

espectro de hospederos y la actividad biológica viral mediante eventos de recombinación genética (Rahman & Gopinathan, 2003). Aunque se han evidenciado algunas problemáticas en el uso de productos a partir de microorganismos recombinantes por el efecto que podrían tener sobre organismos no blanco y la dispersión del gen modificado fuera del contexto ecológico natural, estas modificaciones podrían incluir cambios en el espectro de los hospederos y en la eficacia biológica, como menores dosis, modificaciones estructurales, delección e inserción de genes e inserción de hormonas y toxinas (Cuartas & Villamizar, 2011).



Conclusiones y perspectivas

Uno de los mayores retos que tienen que afrontar las diversas disciplinas involucradas en el control biológico de plagas agrícolas en el futuro cercano es el desarrollo de alternativas medioambientalmente amigables al uso extensivo de insecticidas químicos. Aunque el uso tradicional de bioplaguicidas basados en una o varias cepas aún tiene la mayor participación en el mercado, el desarrollo de estrategias de control microbiológico diferentes a las tradicionales se muestra como promisorio, aunque presentan resultados variables y tienen la necesidad de ser validadas en diferentes sistemas insecto-patógeno.

Con el propósito de abordar estos retos, se requeriría abarcar los problemas desde una visión holística, teniendo en cuenta, además del efecto directo del patógeno, la exploración de sus características bioquímicas, los ciclos biológicos, la compatibilidad con sustancias que se adicionen, concentraciones, tipo de entrega o liberación en el ambiente, esto compaginado con el conocimiento de los umbrales de acción del insecto en el cultivo y el sistema ecológico blanco. La clave es buscar nuevos mecanismos que se puedan combinar como una herramienta más del manejo integrado de plagas, un paradigma que se puede ampliar con la adición de estas nuevas estrategias.

Para el caso específico de la tecnología del ARNi, la ventaja desde el punto de vista de la opinión pública es que no tiene que ver con la modificación genética; sin embargo, aún falta bastante investigación. La respuesta variable en diferentes insectos plaga indica que algunos mecanismos de respuesta son aún desconocidos. Estas pruebas no pueden ser hechas con experimentos de ensayo-error: requieren de un entendimiento racional de las moléculas de ARNdc tanto del tejido de las plantas como del insecto que se alimenta de ellas. También se debe continuar con la investigación en sistemas de producción de bajo costo. Pero, sin duda, es una apuesta que durante la próxima década va a ir aumentando exponencialmente e incluyendo muchos más sistemas.

Agradecimientos

Especial agradecimiento al doctor Mariano Belaich de la Universidad de Quilmes por su aporte en la revisión del presente capítulo.

Referencias

- Ali, K., Wakil, W., Zia, K., & Sahi, S. T. (2015). Control of *Earias vittella* (Lepidoptera: Noctuidae) by *Beauveria bassiana* along with *Bacillus thuringiensis*. *International Journal of Agriculture & Biology*, 17(4), 773-778. doi:10.17957/IJAB/14.0009.
- Arakane, Y., Specht, C. A., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., & Beeman, R. W. (2008). Chitin synthases are required for survival, fecundity and egg hatch in the red flour beetle, *Tribolium castaneum*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(10), 959-962. doi:10.1016/j.ibmb.2008.07.006.
- Arora, N., Ahmad, T., Rajagopal, R., & Bhatnagar, R. K. (2003). A constitutively expressed 36kDa exochitinase from *Bacillus thuringiensis* HD-1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(6), 620-625. doi:10.1016/S0006-291X(03)01228-2.
- Barrios-González, J. (2012). Solid-state fermentation: physiology of solid medium, its molecular basis and applications. *Process Biochemistry*, 47(2), 175-185. doi:10.1016/j.procbio.2011.11.016.
- Barrios-González, J., & Mejía, A. (1996). Production of secondary metabolites by solid-state fermentation. *Biotechnology Annual Review*, 2, 85-121. doi:10.1016/S1387-2656(08)70007-3.
- Baum, J. A., Bogaert, T., Clinton, W., Heck, G. R., Feldmann, P., Ilagan, O., ... Pleau, M. (2007). Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1322-1326. doi:10.1038/nbr1359.
- Behle, R. W., & Jackson, M. A. (2014). Effect of fermentation media on the production, efficacy, and storage stability of *Metarhizium brunneum* microsclerotia formulated as a prototype granule. *Journal of Economic Entomology*, 107(2), 582-590.
- Behle, R. W., Jackson, M. A., & Flor-Weiler, L. B. (2013). Efficacy of a granular formulation containing *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) microsclerotia against nymphs of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixoididae). *Journal of Economic Entomology*, 106(1), 57-63.
- Behle, R. W., Richmond, D. S., Jackson, M. A., & Dunlap, C. A. (2015). Evaluation of *Metarhizium brunneum* F52 (Hypocreales: Clavicipitaceae) for control of Japanese beetle larvae in turfgrass. *Journal of Economic Entomology*, 108(4), 1587-1595.
- Biedma, M. E., Salvador, R., Ferrelli, M. L., Sciocco-Cap, A., & Romanowski, V. (2015). Effect of the interaction between *Anticarsia gemmatalis* multiple nucleopolyhedrovirus and *Epinotia aporema* granulovirus, on *A. gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae. *Biological Control*, 91, 17-21. doi:10.1016/j.biocontrol.2015.07.006.
- Bilgo, E., Lovett, B., Fang, W., Bende, N., King, G. F., Diabate, A., & St. Leger, R. J. (2017). Improved efficacy of an arthropod toxin expressing fungus against insecticide-resistant malaria-vector mosquitoes. *Scientific Reports*, 7, 3433. doi:10.1038/s41598-017-03399-0.
- Bolognesi, R., Ramaseshadri, P., Anderson, J., Bachman, P., Clinton, W., Flannagan, R., ... Moar, W. (2012). Characterizing the mechanism of action of double-stranded RNA activity against western corn rootworm (*Diabrotica virgifera* LeConte). *Plos One*, 7(10), e47534. doi:10.1371/journal.pone.0047534.
- Campbell, R. (1987). *Ecología microbiana*. México D. F., México: Limusa.
- Carthew, R. W., & Sontheimer, E. J. (2009). Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 136(4), 642-655. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035.
- Clarkson, J. M., & Charnley, A. K. (1996). New insights into the mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology*, 4(5), 197-203.
- Corsaro, B. G., Gijzen, M., Wang, P., & Granados, R. R. (1993). Baculovirus enhancing proteins as determinants of viral pathogenesis. En N. E. Beckage, S. N. Thomson, & B. A. Federici (Eds.), *Parasites and Pathogens of Insects*. (Vol. 2: Pathogens, pp. 127-145). Nueva York, EE. UU.: Academic Press.
- Cory, J. S., Hirst, M. L., Williams, T., Hails, R. S., Goulson, D., Green, B. M., ... Bishop, D. H. L. (1994). Field trial of a genetically improved baculovirus insecticide. *Nature*, 370, 138-140. doi:10.1038/370138a0.
- Cuartas, P., & Villamizar, L. (2011). Interacciones de los virus entomopatógenos y su efecto sobre la actividad biológica. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 7(2), 220-239.
- Cuartas, P. E. (2014). *Potenciación de la actividad insecticida de un aislamiento colombiano de nucleopoliedrovirus de Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae) mediante la coinfección con granulovirus (tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Cheng, X. W., & Lynn, D. E. (2009). Baculovirus interactions *in vitro* and *in vivo*. *Advances in Applied Microbiology*, 68, 217-239.
- DaPalma, T., Doonan, B., Trager, N., & Kasman, L. (2010). A systematic approach to virus-virus interactions. *Virus Research*, 149(1), 1-9. doi:10.1016/j.virusres.2010.01.002.
- De Andrade, E. C., & Hunter, W. B. (2016). RNA interference – natural gene-based technology for highly specific pest control (HiSPeC). En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rna-interference-natural-gene-based-technology-for-highly-specific-pest-control-hispec-. doi:10.5772/61612.
- De Dianous, S., Hoarau, F., & Rochat, H. (1987). Re-examination of the specificity of the scorpion *Androctonus australis hector* insect toxin towards arthropods. *Toxicon*, 25(4), 411-417. doi:10.1016/0041-0101(87)90074-2.
- Dos Santos, M. M., Da Rosa, A. S., Dal'Boit, S., Mitchell, D. A., & Krieger, N. (2004). Thermal denaturation: is solid-state fermentation really a good technology for the production of enzymes? *Bioresource Technology*, 93(3), 261-268.
- Down, R. E., Fitches, E. C., Wiles, D. P., Corti, P., Bell, H. A., Gatehouse, J. A., & Edwards, J. P. (2006). Insecticidal spider venom toxin fused to snowdrop lectin is toxic to the peach-potato aphid, *Myzus persicae* (Hemiptera: Aphididae) and the rice brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae). *Pest Management Science*, 62(1), 77-85. doi:10.1002/ps.1119.
- Endoh, T., & Ohtsuki, T. (2009). Cellular siRNA delivery using cell-penetrating peptides modified for endosomal escape. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61(9), 704-709. doi:10.1016/j.addr.2009.04.005.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E., & Mello, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391(6669), 806-811. doi:10.1038/35888.
- Fire, A. Z. (2007). Gene silencing by double-stranded RNA (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 46(37), 6966-6984. doi:10.1002/anie.200701979.
- Friesen, P. D., & Nissen, M. S. (1990). Gene organization and transcription of τED , a lepidopteran retrotransposon integrated within the baculovirus genome. *Molecular and Cellular Biology*, 10(6), 3067-3077.
- Garbutt, J. S., Bellés, X., Richards, E. H., & Reynolds, S. E. (2013). Persistence of double-stranded RNA in insect hemolymph as a potential determiner of RNA interference success: evidence from *Manduca sexta* and *Blattella germanica*. *Journal of Insect Physiology*, 59(2), 171-178. doi:10.1016/j.jinsphys.2012.05.013.
- Gillespie, A. T., & Claydon, N. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. *Pest Management Science*, 27(2), 203-215.
- Goble, T. A., Gardescu, S., Fisher, J. J., Jackson, M. A., & Hajek, A. E. (2016). Conidial production, persistence and pathogenicity of hydromulch formulations of *Metarhizium brunneum* F52 microsclerotia under forest conditions. *Biological Control*, 95, 83-93. doi:10.1016/j.biocontrol.2016.01.003.
- Gordon, K. H., & Waterhouse, P. M. (2007). RNAi for insect-proof plants. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1231-1232.
- Goto, C., Mukawa, S., & Mitsunaga, T. (2015). Two Year Field Study to Evaluate the Efficacy of *Mamestra brassicae* Nucleopolyhedrovirus Combined with Proteins Derived from *Xestia c-nigrum* Granulovirus. *Viruses*, 7(3), 1062-1078. doi:10.3390/v7031062.
- Granados, R. R., Fu, Y., Corsaro, B., & Hughes, P. R. (2001). Enhancement of *Bacillus thuringiensis* toxicity to lepidopterous species with the enhancin from *Trichoplusia* in granulovirus. *Biological Control*, 20(2), 153-159. doi:10.1006/bcon.2000.0891.
- Guo, H., Fang, J., Wang, J., Zhong, W., & Liu, B. (2007). Interaction of *Xestia c-nigrum* granulovirus with peritrophic matrix and *Spodoptera litura* nucleopolyhedrovirus in *Spodoptera litura*. *Journal of Economic Entomology*, 100(1), 20-25. doi:10.1603/0022-0493(2007)100.
- Gurevitz, M., Karbat, I., Cohen, L., Ilan, N., Kahn, R., Turkov, M., ... Gordon, D. (2007). The insecticidal potential of scorpion β -toxins. *Toxicon*, 49(4), 473-489. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.015.
- Guzo, D., Rathburn, H., Guthrie, K., & Dougherty, E. (1992). Viral and host cellular transcription in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus-infected gypsy moth cell lines. *Journal of Virology*, 66(5), 2966-2972.
- Hajos, J., Vermunt, A., Zuidema, D., Kulcsar, P., Varjas, L., De Kort, C., ... Vlak, J. (1999). Dissecting insect development: baculovirus-mediated gene silencing in insects. *Insect Molecular Biology*, 8(4), 539-544. doi:10.1046/j.1365-2583.1999.00150.x.
- Hakim, R. S., Baldwin, K., & Smagghe, G. (2010). Regulation of midgut growth, development, and metamorphosis. *Annual Review of Entomology*, 55, 593-608. doi:10.1146/annurev-ento-112408-085450.
- Harrison, R. L., & Bonning, B. C. (2001). Use of proteases to improve the insecticidal activity of baculoviruses. *Biological Control*, 20(3), 199-209. doi:10.1006/bcon.2000.0899.
- Hayakawa, T., Ko, R., Okano, K., Seong, S.-I., Goto, C., & Maeda, S. (1999). Sequence analysis of the *Xestia c-nigrum* granulovirus genome. *Virology*, 262(2), 277-297. doi:10.1006/viro.1999.9894.

Hayakawa, T., Shimojo, E., Mori, M., Kaido, M., Furusawa, I., Miyata, S., & Granados, R. (2000). Enhancement of baculovirus infection in *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae) larvae with *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus or *Nicotiana tabacum* engineered with a granulovirus enhancin gene. *Applied Entomology and Zoology*, 35(1), 163-170.

Herrera-Estrella, A., & Chet, I. (1999). Chitinases in biological control. *EXS*, 87, 171-184. doi:10.1016/S0144-8617(00)00168-5.

Hoover, K., Humphries, M. A., Gendron, A. R., & Slavicek, J. M. (2010). Impact of viral enhancin genes on potency of *Lymantria dispar* multiple nucleopolyhedrovirus in *L. dispar* following disruption of the peritrophic matrix. *Journal of Invertebrate Pathology*, 104(2), 150-152. doi:10.1016/j.jip.2010.02.008.

Hossain, M., Shimizu, S., Matsuki, M., Imamura, M., Sakurai, S., & Iwami, M. (2008). Expression of 20-hydroxyecdysone-induced genes in the silkworm brain and their functional analysis in post-embryonic development. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 38(11), 1001-1007.

Hubbard, M., Hynes, R. K., Erlandson, M., & Bailey, K. L. (2014). The biochemistry behind biopesticide efficacy. *Sustainable Chemical Processes*, 2, 18. doi:10.1186/s40508-014-0018-x.

Hukuhara, T., & Wijonarko, A. (2001). Enhanced fusion of a nucleopolyhedrovirus with cultured cells by a virus enhancing factor from an entomopoxvirus. *Journal of Invertebrate Pathology*, 77(1), 62-67. doi:10.1006/jipa.2000.4991.

Hukuhara, T., Wijonarko, A., Hosokawa, Y., & Iwano, H. (2003). Enhanced infection of an entomopoxvirus in larvae of the armyworm, *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae), by a granulovirus. *Applied Entomology and Zoology*, 38(2), 255-259.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). (2016). *Virus taxonomy: 2016 Release*. Recuperado de <https://talk.ictvonline.org/taxonomy>.

Ivashuta, S., Zhang, Y., Wiggins, B. E., Ramaseshadri, P., Segers, G. C., Johnson, S., ... Bolognesi, R. (2015). Environmental RNAi in herbivorous insects. *RNA*, 21(5), 840-850. doi:10.1261/rna.048116.114.2.

Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2009). Production of microsclerotia of the fungal entomopathogen *Metarhizium anisopliae* and their potential for use as a biocontrol agent for soil-inhabiting insects. *Mycological Research*, 113(Pt 8), 842-850.

Jackson, M. A., & Jaronski, S. T. (2012). Development of pilot-scale fermentation and stabilization processes for the production of microsclerotia of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* strain F52. *Biocontrol Science and Technology*, 22(8), 915-930.

Jaronski, S. T., & Jackson, M. A. (2008). Efficacy of *Metarhizium anisopliae* microsclerotial granules. *Biocontrol Science and Technology*, 18(8), 849-863.

Jehle, J., Fritsch, E., Huber, J., & Backhaus, H. (2003). Intra-specific and inter-specific recombination of tortricid-specific granuloviruses during co-infection in insect larvae. *Archives of Virology*, 148(7), 1317-1333. doi:10.1007/s00705-003-0104-y.

Kasman, L. M. (2010). *Virus/virus interactions*. Recuperado de <http://virusvirus.net/vvi.php>.

Khachatourians, G. (1991). Physiology and genetics of entomopathogenic fungi. En D. Arora, I. Ajello, & K. Mukerji (Eds.), *Handbook of Applied Mycology*. (Vol. 2: Humans, Animals and Insects, pp. 613-663). Nueva York, EE. UU.: M. Dekker.

Khachatourians, G. (1996). Biochemistry and molecular biology of entomopathogenic fungi. En D. Howard, & J. Miller (Eds.), *Human and animal relationships* (The Mycota, Vol. vi, pp. 331-363). Berlín, Alemania: Springer.

Kiyatkin, N. I., Kulikovskaya, I. M., Grishin, E. V., Beadle, D. J., & King, L. A. (1995). Functional characterization of black widow spider neurotoxins synthesised in insect cells. *European Journal of Biochemistry*, 230(3), 854-859.

Kobori, N. N., Mascarin, G. M., Jackson, M. A., & Schisler, D. A. (2015). Liquid culture production of microsclerotia and submerged conidia by *Trichoderma harzianum* active against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Fungal Biology*, 119(4), 179-190.

Kondo, A., & Maeda, S. (1991). Host range expansion by recombination of the baculoviruses *Bombyx mori* nuclear polyhedrosis virus and *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*, 65(7), 3625-3632.

Kontogiannatos, D., Swevers, L., Maenaka, K., Park, E. Y., Iatrou, K., & Kourti, A. (2013). Functional characterization of a juvenile hormone esterase related gene in the moth *Sesamia nonagrioides* through RNA interference. *Plos One*, 8(9), e73834. doi:10.1371/journal.pone.0073834.

Kourti, A., Swevers, L., & Kontogiannatos, D. (2017). In search of new methodologies for efficient insect pest control: "The RNAi 'Movement'". En V. Shields (Ed.), *Biological control of pest and vector insects*, InTech. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/biological-control-of-pest-and-vector-insects/in-search-of-new-methodologies-for-efficient-insect-pest-control-the-rnai-movement->. doi:10.5772/66633.

Kramer, K. J., & Muthukrishnan, S. (1997). Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 27(11), 887-900.

Kupferschmidt, K. (2013). A lethal dose of RNA. *Science*, 341(6147), 732-733.

Lauzon, H. A., Jamieson, P. B., Krell, P. J., & Arif, B. M. (2005). Gene organization and sequencing of the *Choristoneura fumiferana* defective nucleopolyhedrovirus genome. *Journal of General Virology*, 86(Pt 4), 945-961.

Lecuona, R., & Alves, S. (1988). Efficiency of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill., *B. brongniartii* (Sacc.) Petch. and granulose virus on *Diatraea saccharalis* (F., 1794) at different temperatures. *Journal of Applied Entomology*, 105(1-5), 223-228.

Lednev, G., Kryukov, V. Y., Khodyrev, V., Levchenko, M., Duisembekov, B., Sagitov, A., & Glupov, V. (2008). Dynamics of mortality of the migratory locust under synchronous infection with entomopathogenic fungi (*Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae*) and bacteria *Pseudomonas* sp. *Contemporary Problems of Ecology*, 1(2), 210-213.

Lingg, A., & Donaldson, M. (1981). Biotic and abiotic factors affecting stability of *Beauveria bassiana* conidia in soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 38(2), 191-200.

Liu, M., Cai, Q., Liu, H., Zhang, B., Yan, J., & Yuan, Z. (2002). Chitinolytic activities in *Bacillus thuringiensis* and their synergistic effects on larvicidal activity. *Journal of Applied Microbiology*, 93(3), 374-379. doi:10.1046/j.1365-2672.2002.01693.x.

López-Ferber, M., Simón, O., Williams, T., & Caballero, P. (2003). Defective or effective? Mutualistic interactions between virus genotypes. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 270(1530), 2249-2255. doi:10.1098/rspb.2003.2498.

Luo, K., & Pang, Y. (2006). *Spodoptera litura* multicapsid nucleopolyhedrovirus inhibits *Microplitis bicoloratus* polydnavirus-induced host granulocytes apoptosis. *Journal of Insect Physiology*, 52(8), 795-806.

Ma, X.-M., Liu, X.-X., Ning, X., Zhang, B., Han, F., Guan, X.-M., Zhang, Q.-W. (2008). Effects of *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac and *Beauveria bassiana* on Asiatic corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(2), 123-128.

Maeda, S., Volrath, S. L., Hanzlik, T. N., Harper, S. A., Majima, K., Maddox, D. W., ... Fowler, E. (1991). Insecticidal effects of an insect-specific neurotoxin expressed by a recombinant baculovirus. *Virology*, 184(2), 777-780.

Mamta, B., & Rajam, M. (2017). RNAi technology: a new platform for crop pest control. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 23(3), 487-501. doi:10.1007/s12298-017-0443-x.

Manpreet, S., Sawraj, S., Sachin, D., Pankaj, S., & Banerjee, U. (2005). Influence of process parameters on the production of metabolites in solid-state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2), 1-9.

Mantzoukas, S., Milonas, P., Kontodimas, D., & Angelopoulos, K. (2013). Interaction between the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* subsp. kurstaki and two entomopathogenic fungi in bio-control of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera: Noctuidae). *Annals of Microbiology*, 63(3), 1083-1091.

Mao, Y.-B., Cai, W.-J., Wang, J.-W., Hong, G.-J., Tao, X.-Y., Wang, L.-J., ... Chen, X.-Y. (2007). Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology*, 25(11), 1307-1313. doi:10.1038/nbt1352.

Maurel, V. B., Orliaca, O., & Christen, P. (2003). Sensors and measurements in solid state fermentation: a review. *Process Biochemistry*, 38(6), 881-889.

Mazid, S. (2011). A review on the use of biopesticides in insect pest management. *International Journal of Science and Advanced Technology*, 1(7), 169-178. doi:10.1007/s10886-005-4244-2.

McClintock, J. T., & Dougherty, E. M. (1987). Superinfection of baculovirus-infected gypsy moth cells with the nuclear polyhedrosis viruses of *Autographa californica* and *Lymantria dispar*. *Virus Research*, 7(4), 351-364.

Miller, S. C., Brown, S. J., & Tomoyasu, Y. (2008). Larval RNAi in *Drosophila*? *Development Genes and Evolution*, 218(9), 505-510. doi:10.1007/s00427-008-0238-8.

Mukawa, S., & Goto, C. (2007). Enhancement of nucleopolyhedrovirus infectivity against *Mamestra brassicae* (Lepidoptera: Noctuidae) by proteins derived from granulovirus and a fluorescent brightener. *Journal of Economic Entomology*, 100(4), 1075-1083. doi:10.1603/0022-0493(2007)100.

Mukawa, S., & Goto, C. (2010). *Mamestra brassicae* nucleopolyhedrovirus infection and enhancing effect of proteins derived from *Xestia c-nigrum* granulovirus in larvae of *Mamestra brassicae* and *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) on cabbage. *Journal of Economic Entomology*, 103(2), 257-264. doi:10.1603/EC09211.

Mwamburi, L., Laing, M., & Miller, R. (2009). Interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* for the control of house fly larvae and adults in poultry houses. *Poultry Science*, 88(11), 2307-2314.

Nakasu, E. Y. T., Karamaouna, F., Partsinevelos, G. K., Abd El Halim, H. M., Fitches, E. C., Pyati, P., ... Edwards, M. G. (2016). Sublethal effects of the insecticidal fusion protein ω-ACTX-Hv1a/GNA on the parasitoid *Eulophus pennicornis* via its host *Lacanobia oleracea*. *Pest Management Science*, 72(3), 585-590. doi:10.1002/ps.4030.

Ortiz-Urquiza, A., Luo, Z., & Keyhani, N. O. (2015). Improving mycoinsecticides for insect biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(3), 1057-1068. doi:10.1007/s00253-014-6270-x.

Ortiz, E., & Possani, L. D. (2015). The unfulfilled promises of scorpion insectotoxins. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 21, 16. doi:10.1186/s40409-015-0019-6.

Osman, G. H., Assem, S. K., Alreedy, R. M., El-Ghareeb, D. K., Basry, M. A., Rastogi, A., & Kalaji, H. M. (2015). Development of insect resistant maize plants expressing a chitinase gene from the cotton leaf worm, *Spodoptera littoralis*. *Scientific Reports*, 5, 18067. doi:10.1038/srep18067.

Palli, S., Caputo, G., Sohi, S., Brownwright, A., Ladd, T., Cook, B., ... Retnakaran, A. (1996). CfMNPV

BlocksAcMNPV-Induced Apoptosis in a Continuous Midgut Cell Line. *Virology*, 222(1), 201-213. doi:10.1006/viro.1996.0411.

Palli, S. R. (2014). RNA interference in Colorado potato beetle: steps toward development of dsRNA as a commercial insecticide. *Current Opinion in Insect Science*, 6, 1-8.

Pauli, G. (2009). *Interação de Metarhizium anisopliae (Metsch.), Beauveria bassiana (Bals.) e vírus da granulose, principais patógenos de Diatraea saccharalis (Fabr. 1794) (Lepidoptera: Crambidae)* (tesis de maestría). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, Brasil.

Pelhare, M., & Zlotkin, E. (1982). Actions of insect toxin and other toxins derived from the venom of the scorpion *Androctonus australis* on isolated giant axons of the cockroach (*Periplaneta americana*). *Journal of Experimental Biology*, 97, 67-77.

Peng, G., & Xia, Y. (2014). Expression of scorpion toxin LqhIT2 increases the virulence of *Metarhizium acridum* towards *Locusta migratoria manilensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(11), 1659-1666. doi:10.1007/s10295-014-1497-1.

Peng, G., & Xia, Y. (2015). Integration of an insecticidal scorpion toxin (BjαIT) gene into *Metarhizium acridum* enhances fungal virulence towards *Locusta migratoria manilensis*. *Pest Management Science*, 71(1), 58-64. doi:10.1002/ps.3762.

Perrimon, N., Ni, J., & Perkins, L. (2010). In vivo RNAi: Today and Tomorrow. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2(8), a003640. doi:10.1101/cshperspect.a003640.

Poprawski, T. J., Robert, P. H., & Maniana, N. K. (1985). Susceptibility of the onion maggot *Delia antiqua* (Diptera: Anthomyiidae) to the mycotoxin Destruxin E. *The Canadian Entomologist*, 117, 801-802.

Prabhakar, A., Krishnaiah, K., Janaun, J., & Bono, A. (2005). An overview of engineering aspects of solid state fermentation. *Malaysian Journal of Microbiology*, 1(2), 10-16.

Rahman, M. M., & Gopinathan, K. P. (2003). Analysis of host specificity of two closely related baculoviruses in permissive and nonpermissive cell lines. *Virus Research*, 93(1), 13-23.

Rao, R., Fiandra, L., Giordana, B., de Eguileor, M., Congiu, T., Burlini, N., ... Pennacchio, F. (2004). AcMNPV ChiA protein disrupts the peritrophic membrane and alters midgut physiology of *Bombyx mori* larvae. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 34(11), 1205-1213. doi:10.1016/j.ibmb.2004.08.002.

Ravensberg, W. J. (2011). *A roadmap to the successful development and commercialization of microbial pest control products for control of arthropods*. Dordrecht, Países Bajos: Springer.

Regev, A., Keller, M., Strizhov, N., Sneh, B., Prudovsky, E., Chet, I., ... Schell, J. (1996). Synergistic activity of a *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin and a bacterial endochitinase against *Spodoptera littoralis* larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(10), 3581-3586.

Rohou, A., Nield, J., & Ushkaryov, Y. A. (2007). Insecticidal toxins from black widow spider venom. *Toxicon*, 49(4), 531-549. doi:10.1016/j.toxicon.2006.11.021.

Rothstein, S. J., DiMaio, J., Strand, M., & Rice, D. (1987). Stable and heritable inhibition of the expression of nopaline synthase in tobacco expressing antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8439-8443. doi:10.1073/pnas.84.23.8439.

Scott, J. G., Michel, K., Bartholomay, L. C., Siegfried, B. D., Hunter, W. B., Smagghe, G., ... Douglas, A. E. (2013). Towards the elements of successful insect RNAi. *Journal of Insect Physiology*, 59(12), 1212-1221.

Schultz, K. L., & Friesen, P. D. (2009). Baculovirus DNA replication-specific expression factors trigger apoptosis and shutoff of host protein synthesis during infection. *Journal of Virology*, 83(21), 11123-11132.

Shapiro, M. (2000). Effect of two granulosis viruses on the activity of the gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Economic Entomology*, 93(6), 1633-1637. doi:10.1603/0022-0493.93.6.1633.

Shapiro, M., Preisler, H. K., & Robertson, J. L. (1987). Enhancement of baculovirus activity on gypsy moth (Lepidoptera: Lymantriidae) by chitinase. *Journal of Economic Entomology*, 80(6), 1113-1116.

Shukla, J. N., Kalsi, M., Sethi, A., Narva, K. E., Fishilevich, E., Singh, S., ... Palli, S. R. (2016). Reduced stability and intracellular transport of dsRNA contribute to poor RNAi response in lepidopteran insects. *RNA Biology*, 13(7), 656-669. doi:10.1080/15476286.2016.1191728.

Singh, G., Bhalla, A., Bhatti, J. S., Chandel, S., Rajput, A., Abdullah, A., ... Kaur, P. (2014). Potential of chitinases as a biopesticide against agriculturally harmful fungi and insects. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 3(1), 27-32.

Slavicek, J. M. (2012). *Baculovirus enhancins* and their role in viral pathogenicity. En M. Adoga (Ed.), *Molecular virology* (pp. 147-168), InTech. doi:10.5772/33285. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/molecular-virology/baculovirus-enhancins-and-their-role-in-viral-pathogenicity>.

Smith, M. E., Henkel, T. W., & Rollins, J. A. (2015). How many fungi make sclerotia? *Fungal Ecology*, 13, 211-220.

Song, Z., Lin, Y., Du, F., Yin, Y., & Wang, Z. (2017). Statistical optimisation of process variables and large-scale production of *Metarhizium rileyi* (Ascomycetes: Hypocreales) microsclerotia in submerged fermentation. *Mycology*, 8(1), 39-47.

Song, Z., Shen, L., Zhong, Q., Yin, Y. & Wang, Z. (2016). Liquid culture production of microsclerotia of *Purpureocillium lilacinum* for use as bionematicide. *Nematology*, 18(6), 719-726.

Song, Z., Yin, Y., Jiang, S., Liu, J., Chen, H., & Wang, Z. (2013). Comparative transcriptome analysis of microsclerotia development in *Nomuraea rileyi*. *BMC Genomics*, 14, 411. doi:10.1186/1471-2164-14-411.

Sparks, W. O., Bartholomay, L., & Bonning, B. (2008). Insect immunity to viruses. En N.E. Beckage (Ed.), *Insect Immunology* (pp. 209-242). San Diego, EE. UU.: Academic Press.

Sun, X., Wang, H., Sun, X., Chen, X., Peng, C., Pan, D., ... Hu, Z. (2004). Biological activity and field efficacy of a genetically modified *Helicoverpa armigera* single-nucleocapsid nucleopolyhedrovirus expressing an insect-selective toxin from a chimeric promoter. *Biological Control*, 29(1), 124-137. doi:10.1016/S1049-9644(03)00117-8.

Tenllado, F., Martínez-García, B., Vargas, M., & Díaz-Ruiz, J. R. (2003). Crude extracts of bacterially expressed dsRNA can be used to protect plants against virus infections. *BMC Biotechnology*, 3, 3. doi:10.1186/1472-6750-3-3.

Thakur, N., Mundey, J. K., & Upadhyay, S. K. (2016). RNAi - Implications in entomological research and pest control. En I. Y. Abdurakhmonov (Ed.), *RNA Interference*, InTech. Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/rna-interference/rnai-implications-in-entomological-research-and-pest-control>. doi:10.5772/61814.

Thamthiankul, S., Moar, W., Miller, M., & Panbangred, W. (2004). Improving the insecticidal activity of *Bacillus thuringiensis* subsp. aizawai against *Spodoptera exigua* by chromosomal expression of a chitinase gene. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(2), 183-192. doi:10.1007/s00253-004-1606-6.

Timmons, L., Court, D. L., & Fire, A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*, 263(1-2), 103-112. doi:10.1016/S0378-1119(00)00579-5.

Torres, L., & Cotes, A. (1999). Evaluación de la actividad biocontroladora de hongos entomopatógenos contra *Premnotrypes vorax* (Coleoptera: Curculionidae) mediante su utilización individual y combinada. *Revista Colombiana de Entomología*, 25(3-4), 121-129.

Trung, N. P., Fitches, E., & Gatehouse, J. A. (2006). A fusion protein containing a lepidopteran-specific toxin from the South Indian red scorpion (*Mesobuthus tamulus*) and snowdrop lectin shows oral toxicity to target insects. *BMC Biotechnology*, 6, 18. doi:10.1186/1472-6750-6-18.

Uma Maheswara Rao, C., Uma Devi, K., & Akbar Ali Khan, P. (2006). Effect of combination treatment with entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Nomuraea rileyi* (Hypocreales) on *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology*, 16(3), 221-232.

Waner, J. L. (1994). Mixed viral infections: detection and management. *Clinical Microbiology Reviews*, 7(2), 143-151. doi:10.1128/CMR.7.2.143.

Wang, K., Peng, Y., Pu, J., Fu, W., Wang, J., & Han, Z. (2016). Variation in RNAi efficacy among insect species is attributable to dsRNA degradation *in vivo*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 77, 1-9. doi:10.1016/j.ibmb.2016.07.007.

Wang, L., Salem, T. Z., Lynn, D. E., & Cheng, X.-W. (2008). Slow cell infection, inefficient primary infection and inability to replicate in the fat body determine the host range of *Thysanoplusia orichalcea* nucleopolyhedrovirus. *Journal of General Virology*, 89(Pt 6), 1402-1410.

Washburn, J. O., Haas-Stapleton, E. J., Tan, F. F., Beckage, N. E., & Volkman, L. E. (2000). Co-infection of *Manduca sexta* larvae with polydnavirus from *Cotesia congregata* increases susceptibility to fatal infection by *Autographa californica* M nucleopolyhedrovirus. *Journal of Insect Physiology*, 46(2), 179-190.

Whyard, S., Singh, A. D., & Wong, S. (2009). Ingested double-stranded RNAs can act as species-specific insecticides. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 39(11), 824-832. doi:10.1016/j.ibmb.2009.09.007.

Willetts, H. (1971). The survival of fungal sclerotia under adverse environmental conditions. *Biological Reviews*, 46(3), 387-407.

Wraight, S. P., & Ramos, M. E. (2005). Synergistic interaction between *Beauveria bassiana* and *Bacillus thuringiensis* tenebrionis-based biopesticides applied against field populations of Colorado potato beetle larvae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 90(3), 139-150.

Yanase, T., Yasunaga, C., Hara, T., & Kawarabata, T. (1998). Coinfection of *Spodoptera exigua* and *Spodoptera frugiperda* Cell Lines with the Nuclear Polyhedrosis Viruses of *Autographa californica* and *Spodoptera exigua*. *Intervirology*, 41(6), 244-252. doi:10.1159/000024946.

Yaroslavtseva, O. N., Dubovskiy, I. M., Khodyrev, V. P., Duisembekov, B. A., Kryukov, V. Y., & Glupov, V. V. (2017). Immunological mechanisms of synergy between fungus *Metarhizium robertsii* and bacteria *Bacillus thuringiensis* ssp. morrisoni on Colorado potato beetle larvae. *Journal of Insect Physiology*, 96, 14-20.

Zhang, X., Zhang, J., & Zhu, K. (2010). Chitosan/double-stranded RNA nanoparticle-mediated RNA interference to silence chitin synthase genes through larval feeding in the African malaria mosquito (*Anopheles gambiae*). *Insect Molecular Biology*, 19(5), 683-693. doi:10.1111/j.1365-2583.2010.01029.x.

Zhiqiang, A. (2005). *Handbook of Industrial Mycology*. Nueva York, EE. UU.: Marcel Dekker.

Zoog, S. J., Schiller, J. J., Wetter, J. A., Chejanovsky, N., & Friesen, P. D. (2002). Baculovirus apoptotic suppressor P49 is a substrate inhibitor of initiator caspases resistant to P35 *in vivo*. *The EMBO Journal*, 21(19), 5130-5140.