

## Los microorganismos en el control biológico de insectos y fitopatógenos

Jorge E. Ibarra,\* Ma. Cristina Del Rincón Castro,\* Enrique Galindo,\*\* Martín Patiño,\*\* Leobardo Serrano,\*\* Raymundo García,\*\*\* José A. Carrillo,\*\*\* Benito Pereyra-Alfárez,\*\*\*\* Andrea Alcázar-Pizaña,\*\*\*\* Hugo Luna-Olvera,\*\*\*\* Luis Galán-Wong,\*\*\*\* Liliana Pardo,\*\* Carlos Muñoz-Garay,\*\* Isabel Gómez,\*\* Mario Soberón,\*\* Alejandra Bravo\*\*

**RESUMEN.** En esta revisión se abordará el tema de control biológico de insectos, bacterias y hongos que afectan la producción agrícola. El biocontrol de estos problemas fitosanitarios se puede llevar a cabo con diferentes microorganismos como bacterias, virus y hongos. En este trabajo describimos a detalle el mecanismo de acción de estos organismos. Además, presentamos estrategias novedosas que permiten mejorar el ataque de estos microorganismos hacia sus blancos y se presenta el desarrollo de sistemas de producción y de formulaciones para su aplicación en campo.

**Palabras clave:** Control biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana* y *Metarhizium anisopliae*l. *Trichoderma* spp.

**ABSTRACT.** In this review we cover the biological control of insects, bacteria and fungus that affect different crops. Using different microorganism as bacteria viruses and fungus can do the biological control of these important problems. In this work we describe with detail the mode of action of the different microorganisms used to control insects and plant diseases. We also present novel strategies to improve the efficiency of these microorganisms against their targets and we present the development and production of several formulations to be used in the fields for the biological control of some plant problems.

**Key words:** Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana* y *Metarhizium anisopliae*l. *Trichoderma* spp.

### INTRODUCCIÓN

La mayor parte de los problemas fitosanitarios son causados por hongos, insectos y virus, quienes colonizan diversas partes de la planta, provocando desde la disminución de la calidad del producto y hasta la pérdida total de la planta. El control de plagas y enfermedades depende, en gran parte, de la aplicación de productos químicos. Sin embargo, el uso indiscriminado de estos, ha ocasionado severos problemas de contaminación ambiental y generado la selección de organismos altamente resistentes. Es por estas dos razones que se requieren nuevas estrategias para el control de plagas y enfermedades. La utilización de microorganismos en el control biológico de plagas y de enfermedades es una alternativa atractiva.

En este simposio hemos invitado expertos mexicanos que nos hablen sobre diferentes alternativas de control biológico de plagas y enfermedades, sobre sus estudios respecto a los mecanismos de acción de diferentes microorganismos, así como del mejoramiento genético de las cepas, y sobre el desarrollo de tecnologías para la producción masiva de estos organismos antagonistas útiles en el control de plagas.

#### 1. Mecanismo de acción y utilización de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* en el control biológico de insectos

*Bacillus thuringiensis* (*Bt*) es una bacteria Gram-positiva que produce inclusiones cristalinas durante la fase de esporulación. Existen dos superfamilias de toxinas: Cry y Cyt. Las proteínas Cry son muy específicas, cada toxina tiene su organismo blanco, son inocuas a humanos, y son biodegradables. Se han utilizado como bioinsecticidas en agricultura durante los últimos 40 años. Actualmente se han descrito más de 200 toxinas Cry de *Bt*, sin embargo los productos comerciales se han desarrollado con un número muy reducido de cepas de *Bt* y aun existe una enorme cantidad de insectos plaga contra las cuales no existe una toxina Cry definida, por lo que es necesario desarrollar más productos hacia plagas importantes a nivel comercial.

Por otro lado, resulta interesante que las toxinas Cyt de *Bt* subsp. *israelensis* (*Bti*) potencian sinérgicamente la actividad de las proteínas Cry y retrasan la aparición de insectos resistentes a Cry. El laboratorio de la Dra. Alejandra Bravo se ha dedicado a entender como funcionan las toxinas Cry y cuales son las bases que explican el sinergismo entre toxinas Cyt y Cry. Además han buscado toxinas Cry que tengan alta actividad hacia insectos importantes en México. Se construyó una colección de 600 cepas mexicanas de *Bt* (Bravo *et al.*, 1998). Encontrado una proporción importante de cepas que pudieran contener genes *cry* diferentes a los ya descritos, y se identificó una toxina nueva con actividad contra el coleóptero, conchuela de

\* CINVESTAV Unidad Irapuato, Irapuato, Gto.

\*\* Instituto de Biotecnología UNAM, Cuernavaca, Mor.

\*\*\* CIAD-Culliacán, Culliacán, Sin.

\*\*\*\* Fac. de Ciencias Biológicas, UANL. Monterrey, NL.

fríjol (Peña *et al.*, 2006). El entender como funcionan estas toxinas podrá proporcionar herramientas para tener productos basados en estas proteínas que sean más eficientes y poder garantizar su inocuidad hacia otros organismos.

Las proteínas Cry son sintetizadas como protoxinas que cristalizan formando inclusiones de hasta  $1 \mu\text{m}$  de longitud. Cuando un organismo susceptible ingiere los cristales, éstos son solubilizados en el ambiente alcalino del intestino medio. La protoxina soluble es activada mediante digestión proteolítica. La toxina activa se une a receptores localizados en las microvellosidades de las células del epitelio intestinal. Posteriormente, la toxina o parte de ella se inserta en la membrana formando poros iónicos, llevando eventualmente a la lisis celular. En el laboratorio de Dra. Bravo y Dr. Mario Soberón se propuso que la interacción de la toxina con el primer receptor caderina induce cambios conformacionales en la estructura de la toxina que expone nuevos sitios para digestión proteolítica. Se induce un corte que elimina a la hélice  $\alpha$ -1, este procesamiento expone residuos hidrofóbicos del dominio I que permite la formación de un oligómero de 4 subunidades (Gómez *et al.*, 2002). El oligómero es competente para la inserción en la membrana y es capaz de formar un poro. El oligómero incrementa 200 veces su afinidad hacia el segundo receptor, la aminopetidasa N, la cual se encuentra y/o se moviliza hacia microdominios de membrana

(rafts) donde la composición lipídica de la membrana es favorable para la inserción del oligómero y formación del poro (Bravo *et al.*, 2004). El poro formado por la toxina es poco selectivo permitiendo el paso de diversos cationes monovalentes hacia el interior de las células columnares provocando la despolarización de la membrana plasmática y la entrada de agua hasta la lisis celular (Fig. 1). El mecanismo de acción de las toxinas Cry es muy complejo, se necesitan varios pasos y sería imposible que esta toxina evolucionara para tener efecto en organismos mamíferos, en otros animales o en plantas.

Por otro lado, en el caso de las toxinas Cry activas contra mosquitos, las bacteria *Bti* que sintetiza estas toxinas también sintetiza a las proteínas Cyt, que son muy importantes porque sinergizan la actividad insecticida hacia mosquitos e impiden el desarrollo de insectos resistentes hacia las toxinas Cry. *Bti* se ha utilizado por más de 25 años en África y Asia, y aún no se reportan casos de mosquitos resistentes. Pero ¿porqué no se han generado resistencia a este insecticida? Se ha propuesto que la presencia de ambas toxinas, Cry y Cyt, evita la resistencia, ya que se han podido aislar poblaciones de mosquitos resistentes a las toxinas Cry, pero cuando se les administran las toxinas Cry junto con Cyt se recupera la toxicidad por completo.

Las toxinas Cry y Cyt matan al mosquito porque interactúan con la membrana de las células del intestino y se in-

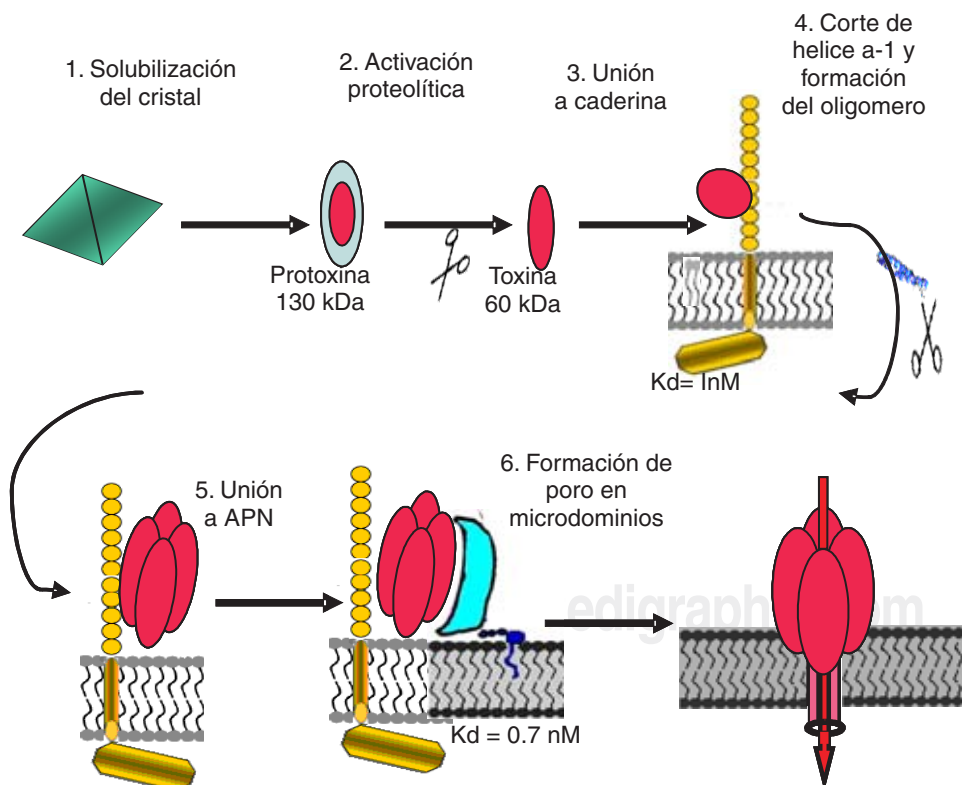


Figura 1. Mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis*.

sertan en ésta membrana formado un poro que termina por romper las células y posteriormente matar al insecto. Cuando un insecto se vuelve resistente, es porque se modificó la proteína que la toxina Cry utiliza como receptor en las células del insecto, es decir la toxina Cry ya no se puede unir a las células y por lo tanto no puede formar el poro.

En el grupo de investigación de la Dra. Bravo y Dr. Mario Soberón encontraron que el mecanismo molecular del sinergismo entre las toxinas Cry y Cyt involucra la interacción entre estas dos toxinas, identificándose las regiones exactas de cada toxina que participan en esta interacción. Se aislaron mutantes puntuales en ambas toxinas y se demostró que se abate por completo el efecto sinérgico (Pérez *et al.*, 2005). También se demostró que la toxina Cyt se inserta a la membrana de los mosquitos muy eficientemente y desde ahí une a la toxina Cry permitiendo que ésta toxina forme oligómeros que interaccionan con la membrana y forman el poro, es decir que la proteína Cyt funciona como un receptor proteico para las toxinas Cry (Fig. 2).

Este mecanismo explica la falta de aparición de insectos resistentes a Bti en la naturaleza y también el mecanismo del sinergismo entre estas toxinas. Este es el primer ejemplo de una bacteria patógena cuya virulencia se basa en toxinas formadoras de poro y que ella misma produce una proteína que funciona como receptor de sus toxinas. Sin duda Bti se puede considerar una bacteria muy inteligente ya que desarrolló un mecanismo que le permite aumentar su actividad toxica y además evitar la aparición de insectos resistentes a sus toxinas.

## 2. Los baculovirus como agentes de control microbiano de insectos

Los baculovirus contienen DNA de doble cadena cuyo tamaño varía de 80 a 130 kb y una partícula viral con forma de bastón. Los viriones se ocluyen en cuerpos de oclusión (CO's) que se conocen como poliedros (Tinsley y Kelly, 1985). Dentro de esta familia se reconocen a dos

géneros: el género *Nucleopolyhedrovirus* los cuales son conocidos como nucleopoliedrovirus (NPV); y el segundo género es el de los *Granulovirus*, conocidos como los granulovirus (GV). Dentro de los NPV existen dos subgrupos: los nucleopoliedrovirus simples (NPVS), que poseen una nucleocápside por envoltura viral y los nucleopoliedrovirus múltiples (NPVM) los cuales pueden tener más de una nucleocápside por envoltura. La especie tipo para los primeros es el virus de *B. mori*, mientras que para los segundos es el NPVM de *Autographa californica* (Lepidoptera: Noctuidae) (AcNPV). Dichos virus se replican únicamente en el núcleo de las células infectadas y sus CO's miden entre 1 y 15  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los GV son baculovirus cuyo poliedro tiene una forma granular y poseen únicamente una nucleocápside por envoltura viral y a su vez un solo virión por gránulo. Son mucho mas pequeños que los NPV (0.2 a 0.5  $\mu\text{m}$ ). La especie tipo es el GV aislado de la "palomilla de la manzana" *Cydia pomonella* (Lepidoptera: Tortricidae). El último grupo es el de los virus no ocluidos (VNO). La característica principal de este grupo es que las nucleocápsides no se encuentran ocluidas en una matriz de proteína (lo cual hace controvertida su inclusión en esta familia de virus) y su replicación se ha observado principalmente en el núcleo de la célula hospedera. La especie tipo la constituye el VNO del "escarabajo de la palma", *Oryctes rhinoceros*. Se han reportado cerca de 600 aislamientos de baculovirus de diferentes insectos (Vlak, 1992). Pero el ICTV solamente reconoce a 30 especies de baculovirus.

En la sintomatología de las infecciones causadas por los baculovirus, las larvas afectadas no presentan síntomas durante los primeros días después de la infección *per os*. Posteriormente, se observa un cambio en el comportamiento del insecto, ya que sus movimientos son más lentos, deja de comer y el crecimiento se detiene (Granados y Williams, 1986). También se observa un cambio de color del integumento y el reblandecimiento del mismo, el cual se torna blanquecino, se rompe, y se libera un fluido blan-

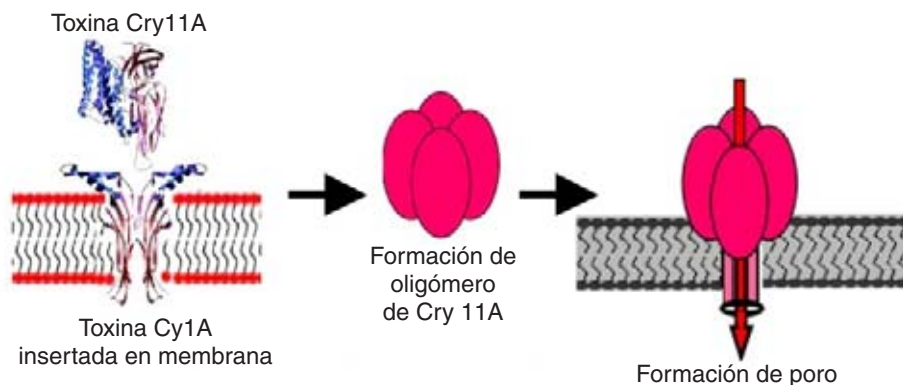


Figura 2. Modelo del sinergismo entre las toxinas Cry11Aa y Cyt1Aa de *Bacillus thuringiensis subsp. israelensis*.

co-grisáceo, que contiene CO's en grandes concentraciones. Finalmente, la larva muerta queda colgando generalmente de las propatas en una posición de V invertida, lo cual es un comportamiento que favorece la dispersión del virus en el medio ambiente.

Existen dos metodologías básicas para producir a los baculovirus como bioinsecticidas: en los individuos susceptibles (*in larva*), o en cultivos *in vitro* de células de insectos. El uso de insectos susceptibles, es sin duda el sistema más utilizado, ya que hasta el momento, ha resultado ser el medio de producción más económico. No obstante, dicho sistema a pesar de su bajo costo, involucra una labor intensiva debido a que se requiere manipular grandes cantidades de insectos vivos, bajo condiciones de insectario. Generalmente, al hospedero se le suministra el virus a través de dietas artificiales contaminadas y se utilizan larvas entre el 3° y 4° estadio, las cuales son susceptibles a los virus y producen grandes cantidades de CO's. Se ha reportado que una buena producción con baculovirus, es cuando se obtienen alrededor de  $5 \times 10^9$  CO's de una larva de *Trichoplusia ni* de 3er estadio. No obstante, se cuenta con una estandarización de la producción de CO's, la cual emplea "equivalentes larvales". Un equivalente larval contiene el número óptimo de CO's que una larva de una especie en particular puede producir (Tanada y Kaya, 1993). En general, las formulaciones para baculovirus, son polvos humectables, los cuales se pueden aplicar fácilmente en el campo, con el equipo tradicional que se utiliza para la liberación de los insecticidas químicos, y la aplicación por aspersión es de las más utilizadas. Sin embargo, se han realizado algunas pruebas de formulaciones en encapsulados con diversos granos, cuyo éxito depende del insecto al cual se quiere combatir.

En México, los baculovirus se han utilizado como agentes de control biológico sólo a escala experimental. Sin embargo, existen algunos grupos que han demostrado gran interés por su introducción. Tal es el caso del grupo del Dr. Trevor Williams del ECOSUR en Tapachula, Chis, quienes trabajan con baculovirus para el control del gusano cogollero *Spodoptera frugiperda* (Cisneros *et al*, 2003). Asimismo, en el norte del país, existe otro grupo de investigación que se ha enfocado en realizar pruebas de campo con un baculovirus derivado del gusano aterciopeado de la soya *Anticarsia gemmatilis*, para el control de plagas insectiles que afectan a este cultivo (Avila Valdez y Rodríguez del Bosque, 2003). Por otro lado, en el noroeste de Sinaloa, el Dr. Edgardo Cortéz, ha evaluado baculovirus a nivel de campo para el control de diversas plagas (Cortez Mondaca *et al*, 2003). Finalmente, nuestro grupo (JEI, MCRC) viene trabajando desde hace 18 años en el estudio de cepas nativas de baculovirus con especificidad hacia el falso medidor de la col *Trichoplusia ni*, tanto en

su caracterización como su evaluación a nivel de laboratorio y campo (Del Rincón Castro e Ibarra, 2003).

Debido a que una de las principales limitantes de los baculovirus como bioinsecticidas es su lento modo de acción, en los últimos años se han diseñado estrategias que permiten incrementar la virulencia (y por ende, disminuir el tiempo de infección) con el objeto de incrementar su potencial como agentes de control biológico. Estas estrategias se basan principalmente en la inserción de genes en el genoma de los baculovirus, los cuales, al expresarse en las primeras etapas de la infección, producen algún factor que aniquila al insecto en corto tiempo, incluso antes de que todos sus tejidos sean infectados. Estos factores son diversos e incluyen: toxinas específicas contra insectos, enzimas metabólicas, reguladores del crecimiento, entre otros.

En el laboratorio del Dr. Jorge E. Ibarra, se ha desarrollado un AcNPV recombinante que se transformó con el gene de una proteína denominada factor potenciador viral presente en forma silvestre en los gránulos del granulovirus de *T. ni* (TnGV). Este factor destruye la membrana peritrófica de la larva (membrana que protege el interior del intestino de los insectos) y permite un acceso más rápido (y por lo tanto una infección más eficiente) de los viriones hacia las células del intestino. El virus recombinante obtenido (BacVEFPol) presentó una virulencia 2.1 veces mayor a la del AcNPV silvestre. Asimismo, presentó un tiempo de mortalidad 1.3 veces menor a la del AcNPV silvestre y que significó una disminución del 22% en el tiempo requerido para matar a las larvas de *T. ni* (Del Rincón-Castro e Ibarra, 2005).

### 3. Hongos entomopatógenos: Quitinasas y proteasas como factores de virulencia

La mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) es considerada una de las plagas de mayor importancia económica a nivel mundial, ya que ataca a cultivos como soya, tomate, algodón, cucurbitáceas y más de 500 especies de plantas ornamentales y malezas de climas cálidos (Osborne *et al.*, 1990). Esta plaga no es bien controlada con insecticidas químicos, debido a una disminución de la sensibilidad a los mismos. Una alternativa a esta problemática la representa el control biológico, dentro del cual se ha utilizado con éxito a los hongos entomopatógenos.

En los últimos años, los hongos entomopatógenos *Paezilomyces fumosoroseus* y *Beauveria bassiana*, se ha utilizado de forma eficiente como agente de control biológico de la mosquita blanca, ya que es un patógeno natural y muy agresivo contra ésta. Sin embargo, la patogenicidad de los hongos es restringida por varios factores físicos y biológicos. Estos últimos comprenden desde la capacidad

de adhesión de la espora a la cutícula, rapidez de germinación y crecimiento de la hifa, además de la capacidad para irrumpir y penetrar la cutícula del insecto mediante la acción conjunta de presión mecánica y degradación de los componentes de la cutícula, mediante la acción de enzimas secretadas por el hongo (Hayek y St. Leger. 1994).

Varias enzimas, principalmente proteasas y quitinasas, que degradan la proteína y quitina de la cutícula del insecto, han sido identificadas y caracterizadas en hongos entomopatógenos como *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Muchas investigaciones se han realizado con el fin de entender la función de estas enzimas durante eventos de patogenicidad, y aunque la mayoría de los estudios se han enfocado hacia la actividad de las proteasas, existen evidencias de que las quitinasas también influyen en la patogenicidad fúngica (El-Sayed *et al.*, 1989; Hernández-Torres *et al.*, 2004).

En la cutícula, la quitina constituye alrededor del 30 % y las proteínas con casi el 40% se encuentran formando una barrera estructural que debe ser hidrolizada por quitinasas y proteasas para que las hifas alcancen y se dispersen en la homocela. Por lo tanto, estas exoenzimas juegan un papel importante en la hidrólisis de la cutícula del insecto y su actividad se ha relacionado con la virulencia del hongo (Gupta *et al.*, 1994).

En el laboratorio del Dr. Benito Pereyra se han obtenido mutantes con un incremento en la producción o mayor actividad enzimática de quitinasas y proteasas de los hongos *P. fumosoroseus* y *B. bassiana*, respectivamente.

Los ensayos de mutagénesis se iniciaron con un inóculo de  $10^{13}$  conidias/ml. De acuerdo a los resultados de sobrevivencia, se tomaron 3 min para los ensayos de mutagénesis (Fig. 3). A partir de este tiempo, obtuvieron un total 220 colonias para *P. fumosoroseus* (quitinasas) y 318 para *B.*

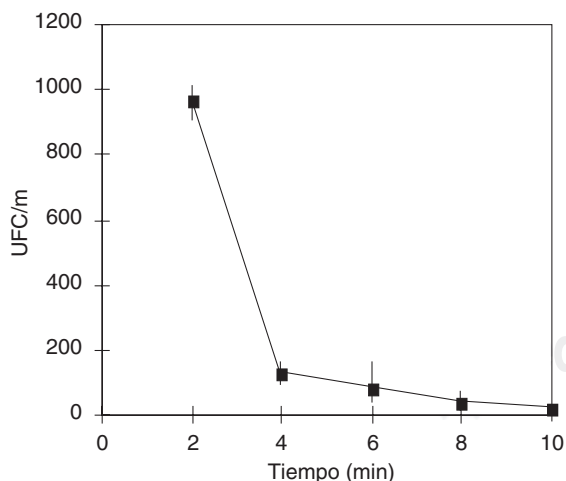


Figura 3. Sobrevivencia de *B. bassiana* a la luz UV.

*bassiana* (proteasas). Para quitinasas, seleccionaron la cepa M-84, la cual resultó ser estable bioquímica y genéticamente. Esta cepa produjo una sola quitinasa de 28 kDa con 18 veces más actividad específica que la paterna. No se observó alteración ni en su sistema de regulación ni en la producción de biomasa o consumo de azúcares. Sin embargo la actividad biológica contra la mosquita blanca (*B. tabaci*) y el falso medidor de la col (*Trichoplusia ni*), fue superior tanto en reducción del peso de las larvas (*T. ni*) como en el porcentaje de mortalidad, alcanzando el doble contra *B. tabaci* (Tabla 1). Con respecto a *B. bassiana*, obtuvieron 24 colonias con halos de hidrólisis superiores a la paterna, de las cuales llaman la atención las mutantes 7, 36 y 82, las cuales presentan patrones de proteasas distintas a la paterna. Estas enzimas han sido caracterizadas para tener actividad tipo quimi tripsina y elastasa. Su acción sobre lepidópteros y homópteros esta en progreso.

#### 4. Control biológico de fitopatógenos

Las pérdidas de productos agrícolas debido al ataque de fitopatógenos (principalmente hongos) pueden alcanzar hasta el 50 % de la producción nacional. Debido a la importancia crucial que tiene la agricultura dedicada a productos de exportación en nuestro país, es importante desarrollar tecnologías para la producción, formulación y aplicación de agentes de control biológico (ACB) de fitopatógenos. Antes de que un agente de control biológico sea introducido con éxito en el mercado, es indispensable llevar a cabo una serie de evaluaciones. Después de la selección inicial de un aislado microbiano eficaz, es importante estudiar su ecología, fisiología y modo de acción. De manera paralela, debe desarrollarse un sistema de producción y formulación del ACB para obtener un producto con una vida de anaquel suficientemente alta y que provea al producto ventajas competitivas en el ambiente en el cual será aplicado. Posteriormente, se debe escalar el proceso a nivel piloto para la obtención de cantidades de producto suficientes para llevar a cabo su evaluación en invernadero y campo. Finalmente, si el producto presenta atributos suficientes y su producción es viable tanto técnica como

Tabla 1. Actividad biológica de la mutante M-84 de *P. fumosoroseus* sobre *T. ni* y *B. tabaci*.

Cepa	<i>T. ni</i>		Mortalidad (%)	
	No.	Peso (mg)	<i>B. tabaci</i>	<i>T. ni</i>
Control	44	35.2 (12.21)	5.64 (3.35)	4.21 (2.94)
Pfr612	48	18.1 (15.42)	22.28 (15.36)	51.20 (11.44)
M-84	44	9.4 (5.39)	41.00 (11.62)	60.53 (12.79)

económicamente, se lleva a cabo el registro y se inicia la comercialización del producto. Todo lo anterior implica la participación de un grupo multidisciplinario de investigadores (Serrano y Galindo, 2006). Tal es el caso de la colaboración entre los fitopatólogos del CIAD-Culiacán y los ingenieros bioquímicos del IBT-UNAM, quienes han abordado el desarrollo de productos para el control biológico de hongos fitopatógenos que producen considerables pérdidas económicas en dos de los cultivos más importantes de Sinaloa: el mango (antracnosis) y el garbanzo (rabia).

#### 4a. Antagonistas de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis en mango

México es uno de los principales productores de mango a nivel mundial. En el 2001 se produjeron un millón y medio de toneladas de este fruto. Una de las enfermedades importantes que afecta al mango es la antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, el cual daña la calidad y disminuye significativamente la vida de anaquel del producto. En un proyecto conjunto (Galindo *et al.*, 2005) entre el IBT-UNAM y el CIAD-Culiacán se aislaron, seleccionaron e identificaron diferentes microorganismos (bacterias y levaduras) con actividad antagónica contra la antracnosis en mango. Se diseñaron medios de cultivo con componentes de bajo costo que permitieron lograr cultivos de alto rendimiento, viabilidad y productividad. Se desarrollaron procesos de fermentación sumergida para la producción de células viables de cada una de las cepas en fermentadores de hasta 100 L de capacidad. El producto mantiene su viabilidad dentro de los niveles de efectividad hasta por 12 meses. Los resultados de las pruebas de campo mostraron que los antagonistas utilizados

lograron disminuir la incidencia de la antracnosis tanto en pre- como en post-cosecha. Esta protección fue mayor, en algunos casos, que la obtenida utilizando un fungicida químico (Fig. 4). Otro aspecto de gran importancia radica en el hecho de que los formulados biológicos retrasan la maduración del fruto, alargando su vida de almacén hasta en un 25 % sin afectar su calidad. Esto ofrece la posibilidad al productor de exportar sus frutos a mercados más lejanos y con mayor precio de comercialización.

#### 4b. Control biológico de la rabia del garbanzo (*Cicer arietinum* L.)

La zona del noroeste de México, se considera como líder nacional en la producción y exportación de garbanzo blanco, donde Sinaloa, participa con el 75 % de la producción. La rabia del garbanzo (*Fusarium*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*) es el principal limitante de la producción en la mayoría de áreas dedicadas a este cultivo en el mundo. Al igual que en el caso anterior se aislaron y seleccionaron cepas del género *Trichoderma* con potencial para controlar a *Fusarium oxysporum* f. sp. *Ciceris*.

Se estudiaron aspectos como la composición y el pH del medio de cultivo, la temperatura, la agitación, así como aspectos de formulación y secado para la obtención de un producto en polvo con alta viabilidad. Se estableció un proceso estándar de cultivo sumergido en fermentadores de hasta 30 L de capacidad. Por otra parte, se estandarizó un proceso de recuperación, formulación y secado de las esporas que permite la obtención de un producto con un alto porcentaje de recuperación y una vida de anaquel de, al menos, 12 meses en refrigeración. El uso del formulado producido en la Planta Piloto del IBT-UNAM permitió

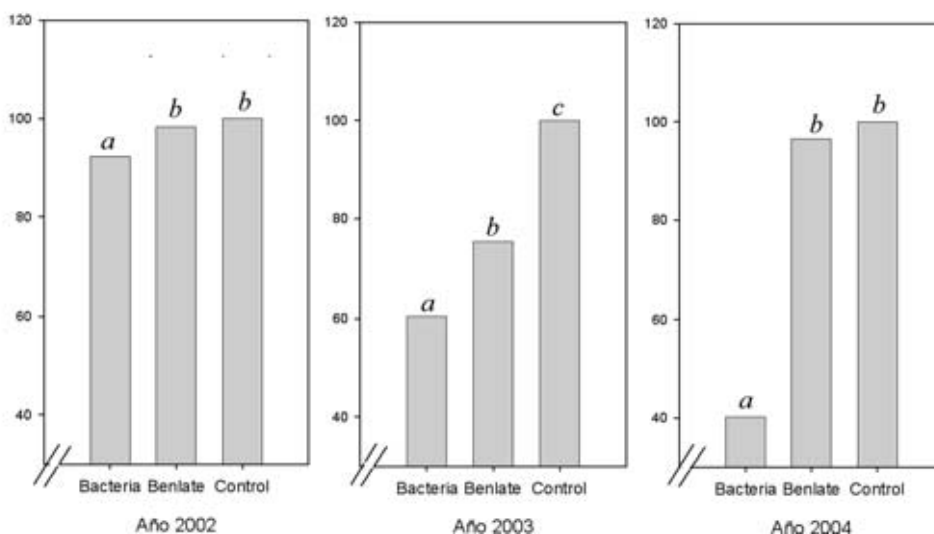


Figura 4. Control de la antracnosis del mango.

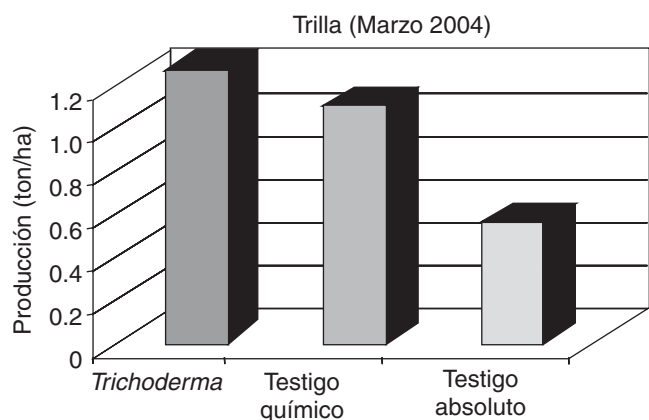


Figura 5. Control biológico de la rabia del garbanzo.

recuperar la rentabilidad del cultivo en áreas donde la enfermedad no permitía recuperar la inversión realizada (Fig. 5).

#### CONCLUSIONES

El esta revisión se identificaron bacterias (*B. thuringiensis*, *B. subtilis*), baculovirus (NPV y GV) y hongos (*P. fumosoroseus*, *B. bassiana*, *M. anisopliae* y *T. harzianum*) que permiten el control de insectos plaga y de fitopatógenos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Sclerotium* en cultivos de importancia agronómica en nuestro país.

Se describió a detalle el mecanismo de acción de las toxinas Cry de *Bt* en donde se observa que la alta especificidad se basa en la interacción con diferentes receptores y se mostró que la bacteria *Bt israelensis* produce una proteína (Cyt) que funciona como receptor de sus otras toxinas (Cry). De esta manera *Bti* desarrolló un mecanismo que le permite aumentar su actividad tóxica y evitar la aparición de insectos resistentes a sus toxinas.

Se presentaron algunas estrategias novedosas, como el generar un virus AcNPV recombinante específico para el falso medidor de la col *T. ni* que expresa la proteína del factor potenciador viral del GV. Este factor destruye la membrana que protege el interior del intestino de los insectos y permite un acceso más rápido a las células, por lo que lo vuelve más virulento hacia larvas de *T. ni*. En un segundo desarrollo se obtuvieron mutantes de los hongos *P. fumosoroseus* y *B. bassiana*, que presentan un incremento en la producción o con mayor actividad enzimática de quitinasas y proteasas. Estas enzimas degradan la cutícula del esqueleto del insecto y permiten un ataque más efectivo del hongo entomopatógeno.

Finalmente, se presentó el desarrollo de sistemas de producción y de formulaciones efectivas que lograron dis-

minuir tanto la incidencia de la antracnosis de mango en pre- y post-cosecha como de la rabia del garbanzo. De esta manera se generó tecnología que mejoró importantemente los rendimientos y/o la calidad de estos cultivos.

Podemos decir que el desarrollo de estrategias para el control de plagas utilizando diversos microorganismos, permitirá sustituir paulatinamente el uso de insecticidas y biocidas químicos, lo que podría aumentar la exportación de nuestros productos a otros países por estar libres de contaminantes, protegería a los campesinos y al medio ambiente a través del uso de sustancias no tóxicas y aumentaría la productividad.

#### AGRADECIMIENTOS

EG, MP, LS, RE y AC agradecen el apoyo económico de SAGARPA-CONACyT (2002-C01-0741) y de DGAPA-UNAM (IN-203905 & IN-216905); MS y AB agradecen a DGAPA-UNAM (IN206503) y al CONACyT (46176-Q); JI y CR al CONACyT (26312N) y BP a UANL-PAICYT (908-04).

#### REFERENCIAS

1. Avila Valdez, J. & L. A. Rodríguez del Bosque. 2003. Uso de los nucleopoliedrovirus de *Anticarsia gemmatalis* como principal estrategia del MIP en soya de la región sur de Tamaulipas. Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico. Guadalajara, Jal. pp. 327-330.
2. Bravo, A., S. Sarabia, L. Lopez, H. Ontiveros, C. Abarca, A. Ortiz, M. Ortiz, L. Lina, F. J. Villalobos, G. Peña, M-E Nuñez-Valdez, M. Soberón & R. Quintero. 1998. Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. Appl. Environm. Microbiol 64:4965-4972.
3. Bravo, A., I. Gómez, J. Conde, C. Muñoz-Garay, J. Sánchez, R. Miranda, M. Zhuang, S. S. Gill & M. Soberón. 2004. Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. Biochim. Biophys. Acta. 1667:38-46.
4. Cisneros, J., D. I. Penagos & T. Williams. 2003. Potencial de un nucleopoliedrovirus para el control de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) en el maíz. Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico. Guadalajara, Jal. pp. 315-318.
5. Cortez Mondaca, E., E. Cabanillas Durán & J.L. Martínez Carrillo. 2003. Evaluación de dos nucleopoliedrovirus sobre dos especies de noctuidos de importancia económica en el norte de Sinaloa. Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico. Guadalajara, Jal. pp. 331-334.
6. Del Rincon Castro, M. C. & J. E. Ibarra. 2003. Aislamiento y caracterización de cepas nativas de nucleopoliedrovirus patógenas a *Trichoplusia ni* (Lepidoptera:Noctuidae) en México, y su potencial como agentes de control. Memorias del XXVI Congreso de Control Biológico. Guadalajara, Jal. pp. 311-314.
7. Del Rincon Castro, M.C. & J.E. Ibarra. 2005. Effect of a Nucleopolyhedrovirus of *Autographa californica* Expressing the Enhancer Gene of *Trichoplusia ni* Granulovirus on *T. ni* Larvae. Biocontrol Science and Technology 15:701-710.

8. El-Sayed, G. N., T. A. Coudron, C. M. Ignoffo & G. Riba. 1989. Chitinolytic activity and virulence associated with native and mutant isolates of an entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. J. Invertebr. Pathol. 54:394-403.
9. Galindo, E., A. Carrillo, R. García & M. Patiño. 2005. Tecnologías para el control de la principal enfermedad del mango (Antracnosis) y el efecto en su calidad postcosecha. Claridades Agropecuarias, 148:50-59.
10. Gómez I., J. Sánchez, R. Miranda, A. Bravo & M. Soberón. 2002. Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix a-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. FEBS Lett. 513:242-246.
11. Granados, R. R. & K. A. Williams. 1986. *In Vivo* infection and replication of baculoviruses, pp.89-108. In: R.R. Granados y B.A. Federici (Eds.). The biology of baculoviruses. Vol.I. CRC Press. Boca Ratón, Florida.
12. Gupta, S. C., T. D. Leathers, G. N. El-Sayed & C. M. Ignoffo. 1994. Relationships among enzyme activities and virulence parameters in *Beauveria bassiana* infections of *Galleria mellonella* and *Trichoplusia ni*. J. Invertebr. Pathol. 64:13-17.
13. Hajek, A. E. & R. J. St. Leger. 1994. Interactions between fungal pathogens and insect host. Annu. Rev. Entomol. 39:293-322.
14. Hernández-Torres, I., M. Iracheta, L. J. Galán-Wong, C. Hernández, J. Contreras, M. Jackson & B. Pereyra-Alfárez. 2004. A *Paecilomyces fumosoroseus* mutant over-producing chitinase displays enhanced virulence against *Bemisia tabaci*. W. J. Microbiol. Biotechnol. 20:207-210.
15. Osborne, L. S., G. K. Storey, C. W. McCoy & J. F. Walter. 1990. Potential of controlling the sweet potato whitefly *Bemisia tabaci*, with the fungus *Paecilomyces fumosoroseus*, pp. 386-390. In: "Proceedings and abstracts of 5<sup>th</sup> International Colloquium on Invertebrate Pathology and Microbial Control". Adelaide, Australia
16. Peña, G., J. Miranda-Rios, G. de la Riva, L. Pardo, M. Soberón & A. Bravo. 2006. A *Bacillus thuringiensis* S-layer protein involved in toxicity against *Epilachna varivestis* (Coleoptera: Coccinellidae). Appl. Environm. Microbiol. 72:353-360.
17. Pérez, C., L. E. Fernandez, J. Sun, J. L. Folch, S. S. Gill, M. Soberón & A. Bravo. 2005. *Bti* Cry11Aa and Cyt1Aa toxins interactions support the synergism-model that Cyt1Aa functions as membrane-bound receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 102:18303-18308.
18. Serrano L., & E. Galindo. 2006. Desarrollo tecnológico para el control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario. Ciencia (En prensa).
19. Tanada, Y. & H. K. Kaya. 1993. Insect pathology, 666p. Academic Press. San Diego, California.
20. Tinsley, T.W. & D. C. Kelly. 1985. Taxonomy and nomenclature of insect pathogenic viruses. pp.3-25. In: K. Maramorosh y K.E. Sherman (Eds.). Viral insecticides for biological control. Academic Press. Orlando, Florida.
21. Vlak, J. M. 1992. The biology of baculovirus *In Vivo* and *In Cultured Insect Cells*. pp.2-10. In: J.M. Vlak, E.J. Schlaeger y A.R. Bernard (Eds.). Baculovirus and recombinant protein production processes. Editions Roche. Interlakend, Switzerland.

Correspondencia:

**Alejandra Bravo**

Instituto de Biotecnología UNAM Ap.  
Postal 510-3 Cuernavaca 62250, Mor.  
México. Teléfono: 52 777 3291635.  
Fax 52 777 3291624 bravo@ibt.unam.mx