

## Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga

María Teresa Carrillo-Rayas\* y Alejandro Blanco-Labra\*

### RESUMEN

El presente artículo enfatiza el uso de una alternativa ecológica para el control eficaz de plagas. Considerando que existe una preocupación general sobre los efectos negativos de los pesticidas químicos en la salud pública y/o en el medio ambiente, una alternativa consiste en el aprovechamiento de patógenos naturales de insectos. El uso de hongos entomopatógenos (HEP) como agentes de control biológico ha sido considerado a nivel mundial; estos hongos son ampliamente reconocidos por su potencial como agentes de control biológico. Debido a su modo de infección distintivo, los hongos pueden tener un papel único o complementario como agentes de control de insectos plaga. A diferencia de otros agentes entomopatógenos, como bacterias, virus o protozoarios, los HEP no requieren ser ingeridos por su hospedero para causar la infección; en su lugar, las esporas pueden penetrar directamente a través de la cutícula. Este modo de infección es posible gracias a la acción coordinada de enzimas hidrolíticas, además de la presión mecánica ejercida en el punto de contacto. Las enzimas participantes son factores determinantes en el éxito de la infección.

### ABSTRACT

This paper describes the use of an ecological alternative to control insect pests. One viable strategy, developed to answer the growing concern about the negative effects that chemical pesticides have on human health and/or the environment, consists in exploiting the use of natural insect pathogens. Among several options, the use of entomopathogenic fungi (EMF) as possible microbial control agents has been considered worldwide. EMF are widely recognized for their potential use as biological control agents. Due to their distinctive mode of action, EMF could have a unique and/or complementary role in insect control. Unlike bacterial, viral or protozoan entomopathogens, EMF do not require to be ingested by their host; instead, germinating fungal spores can penetrate directly through the insect's cuticle. This mode of infection is possible thanks to the synergistic effect of cuticle-degrading enzymes, plus the mechanic pressure produced upon their contact. The enzymes participating in this process are a determinant factor for an effective infection.

Recibido: 29 de Octubre de 2008  
Aceptado: 12 de Mayo de 2009

### INTRODUCCIÓN

Desde los inicios de la agricultura los cultivos agrícolas han sufrido gran devastación por los ataques de insectos plaga, por lo que, paulatinamente, el hombre ha desarrollado estrategias para su control. A pesar del uso intensivo de insecticidas, la destrucción de las cosechas por insectos plaga es un serio problema a nivel mundial, que repercute en grandes pérdidas anuales. La FAO (Food and Agriculture Organization) estima que se pierde, durante el almacenaje, entre 5% y 10% de todos los granos alimenticios cosechados, a causa de los insectos, ácaros, roedores y hongos. En América Latina las pérdidas varían entre el 25% al 50% en la cosecha de cereales; en la India y ciertos países africanos, las pérdidas son del 30%, mientras que en algunas zonas del Suroeste de África se pierde hasta el 50% de algunos cultivos. De ahí que cualquier metodología que ayude a resolver este problema puede tener importantes consecuencias económicas y sociales, además de disminuir la cantidad de insecticidas aplicados en el campo. Debido a que el control de plagas se efectúa principalmente a través del uso de plaguicidas químicos, se estima que 5 millones de toneladas de produc-

#### Palabras clave:

Entomopatógenos; Biocontrol; Proteasas de Hongos; Hidrolasas de Hongos; Bioinsecticidas.

#### Keywords:

Entomopathogens; Biocontrol; Fungal Proteases; Fungal Hydrolases; Bio-Insecticides.

\* Cinvestav-Unidad Irapuato. Km 9.6 libramiento norte carretera Irapuato-León, C.P. 36821, Irapuato, Gto. México. Teléfono (462) 623 9600. Fax (462) 624 5996. Correos electrónicos: mcarrill@ira.cinvestav.mx y ablanco@ira.cinvestav.mx.

tos químicos son aplicados anualmente en el mundo; sin embargo, a pesar de su eficiencia, estos compuestos carecen de selectividad, por lo que resultan altamente perjudiciales para la salud humana y los ecosistemas (Hajek y St Leger, 1994). Además, por su persistencia en el medio ambiente, favorecen la selección de insectos resistentes a ellos, lo que ha motivado el uso de dosis cada vez mayores o de productos cada vez más tóxicos (Asaff y col., 2002). Del mismo modo, su uso conlleva consecuencias adicionales como la disminución de la fertilidad del suelo, la reducción de la biodiversidad, la contaminación de aguas subterráneas, ríos y lagos, con consecuencias globales negativas sobre la atmósfera y el clima (Stuart y col., 1997). Todo esto ha generado preocupación en el ámbito mundial y actualmente se trabaja para limitar la aplicación de los insecticidas químicos y promover el manejo integrado de plagas (MIP).

### EL MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS (MIP)

El manejo Integrado de plagas (MIP) plantea el uso racional de métodos culturales, biológicos y químicos para el control de insectos, ácaros y otras plagas. En el MIP el control biológico es el primordial, pero se puede justificar o “integrar” el uso adecuado de productos químicos sólo cuando la densidad de la plaga es de tal magnitud que sobrepasa el umbral de daño económico y a la vez, la presencia de enemigos naturales es escasa (Restrepo, 1988).

Entre las ventajas del MIP, están sus costos, además de que las exigencias del mercado y las leyes de inocuidad alimentaria que demanda la globalización actual, obligan a buscar alternativas al uso de los plaguicidas. Por otra parte, el uso intensivo y constante de plaguicidas sintéticos, por más de cuatro décadas, ha favorecido la aparición de insectos resistentes, lo que ha motivado en los productores mexicanos un creciente interés por el uso de organismos benéficos. Actualmente existen programas de MIP para las principales plagas agrícolas del país y el sector privado empieza a ofrecer paquetes de MIP para cultivos específicos como brócoli, caña, nogal y algodón. La mayoría de los programas operan con asesoría y apoyo de oficinas gubernamentales o instituciones de investigación y educación superior. Algunas de las técnicas que ofrece el sector privado incluyen el muestreo, la determinación de umbrales de acción y el uso racional de agroquímicos. Entre todas las técnicas de control del MIP, el control biológico es el que ha tenido el mayor desarrollo en México (Saad, 1999). Existen en el país diversas instituciones dedicadas al estudio y/o aplicación del control biológico de plagas, entre ellas: El Instituto de Fitosanidad (Colegio de Postgraduados), el Colegio de la Frontera Sur, el Instituto Nacional

de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias, la Universidad Autónoma de Nuevo León, y el Centro Nacional de Referencia de Control Biológico.

Otra aplicación clara de la biotecnología al MIP es la generación de plantas resistentes a plagas a través de la ingeniería genética, permitiendo la transferencia de genes de manera más precisa y específica, lo que ha generado sistemas de transformación eficiente para la mayoría de los cultivos de importancia agronómica. Los procedimientos para introducir genes de diversos orígenes son muy eficientes a nivel experimental y las plantas transgénicas con nuevas resistencias a plagas son sujetas a certificación en el campo de acuerdo con las regulaciones vigentes. Estas plantas están siendo producidas y comercializadas intensamente en diferentes países, principalmente en los Estados Unidos, Canadá, Argentina y China.

La manipulación genética de las especies vegetales se vislumbra como una de las técnicas biotecnológicas más prometedoras en el Manejo Integrado de Plagas, representando la posibilidad de obtener variedades resistentes a patógenos y enfermedades (virus, hongos y bacterias), resistentes a insectos y tolerantes a herbicidas, de manera rápida y precisa. En México, el MIP se ha desarrollado marginalmente, aún cuando en algunas áreas hay amplia experiencia; un ejemplo de ello es el control biológico de plagas, particularmente la cría de insectos benéficos. Con respecto a la obtención de productos agrobiológicos, pequeñas empresas han comenzado su elaboración y comercialización, principalmente basados en hongos entomopatógenos y toxinas de *Bacillus thuringiensis*; sin embargo, aunque el mercado potencial es muy grande, falta llevar a cabo una labor de educación hacia los pequeños productores, con la finalidad de mostrarles los beneficios que les pueden aportar (Saad, 1999).

Otra forma de control que no está comprendida dentro de los programas de MIP, pero tiene sin duda un efecto importante en la sanidad de los cultivos, es el control legal. Así se conoce al conjunto de disposiciones existentes en un país o región para regular el intercambio comercial de productos agrícolas, con la intención de evitar el movimiento y la introducción de fitoparásitos.

### CONTROL BIOLÓGICO

Como **control biológico** se entiende la manipulación intencional de las poblaciones de los enemigos naturales de los insectos plaga, con el fin de limitar sus poblaciones. A estos organismos se les llama agentes de control y entre ellos se encuentran insectos

depredadores y parásitos, así como microorganismos patógenos de insectos. (Asaff y col., 2002). El control biológico pretende en primer lugar, que las plagas no sean erradicadas, sino reguladas o controladas antes de rebasar el umbral económico; en segundo lugar busca que los enemigos naturales pertenecientes al ambiente del cultivo sean conservados mediante el manejo adecuado del agroecosistema (control biológico conservativo o natural) o, en caso necesario, por la adición regular de estos (control biológico aumentativo). En ocasiones, especies provenientes de otra regiones son introducidas y establecidas para reducir las poblaciones plaga (control biológico clásico) (García de León y Mier, 2003). Los diferentes métodos de control biológico constituyen un componente sustentable y ambientalmente seguro del moderno manejo de plagas; son una alternativa deseable, que se ha ido incrementando en detrimento de la dependencia exclusiva de los plaguicidas químicos (Waage, 1991).

En los últimos años, ha surgido gran interés en el uso de hongos entomopatógenos (HEP) como agentes de control biológico, habiéndose alcanzado un avance significativo en el desarrollo y manufactura de estos agentes. Los HEP ofrecen un potencial para el control de insectos plaga, pero su introducción dentro del ambiente demanda un cuidado y enfoque responsable, particularmente si los hongos no son endémicos al área. Para seleccionar un HEP con el fin de utilizarse como bioinsecticida dentro de un programa de MIP, es importante identificar las características de virulencia contra el insecto plaga, además de conocer su variabilidad bioquímica, para así seleccionar el aislado con las mejores características (Hajek y St. Leger, 1994). Los HEP tienen la capacidad de infectar activamente una gran diversidad de insectos; están ampliamente distribuidos en diferentes ecosistemas por lo que se pueden utilizar para el control de plagas de insectos, siendo inoocuos para animales de sangre caliente, plantas y demás componentes del ecosistema. Además, los HEP tienen la capacidad de desarrollar epizootias, definida como enfermedades que se extienden a una o varias especies dentro de una región o país, con carácter transitorio, en las poblaciones de insectos plaga (Jackson y col., 1997). Los hongos tienen algunas ventajas únicas entre los entomopatógenos ya que son capaces de infectar al hospedero, por contacto y adhesión de las esporas a las paredes bucales, membranales, intersegmentales o a través de los espiráculos, por lo que la ingestión del microorganismo es innecesaria (Hajek y St. Leger, 1994; Pucheta-Díaz y col., 2006). Existen más de 700 especies de HEP (Feng y col., 1994; Hajek y St. Leger, 1994), entre las que se mencionan: *Metarhizium spp.*, *Beauveria spp.*, *Aschersonia spp.*, *Entomophthora spp.*,

*Zoophthora spp.*, *Erynia spp.*, *Eryniopsis spp.*, *Akanthomyces spp.*, *Fusarium spp.*, *Hirsutella spp.*, *Hymenostilbe spp.*, *Paecilomyces spp.* y *Verticillium spp.*, pertenecientes a la clase Zygomycota e Hyphomycota. Muchas de estas especies tienen un amplio rango de hospederos y son patógenicas de diferentes órdenes de insectos como: Lepidoptera, Coleoptera o Hemiptera. Como ejemplos se pueden mencionar *Metarhizium anisopliae*, que ataca ortópteros y homóteros, en general, *Beauveria bassiana*, (coléopteros, lepidópteros y dípteros), *Verticillium lecanii*, (áfidos, moscas blancas y tisanópteros), *Paecilomyces spp* (lepidópteros, coleópteros y ortópteros) los cuales, junto con otros Deuteromycetos, tienen gran potencial como agentes de control biológico de plagas (Zimmermann, 1986). Estos microorganismos están asociados con los insectos en diferentes hábitats, incluyendo agua, suelo, y lugares aéreos (Hajek y St. Leger, 1994). Se establece así que los hongos son potencialmente los más versátiles entomopatógenos, siendo algunos productores de toxinas, lo que les provee de un potencial para dañar rápidamente; sin embargo, usualmente son patógenos de acción lenta. Estos hongos infectan huevos, larvas, ninfas, pupas o adultos y la infección puede ocurrir después de la germinación de la espora dentro de los intestinos del hospedero o en la superficie de la cutícula (Hajek y St. Leger, 1994).

Recientemente varios micoinsecticidas han entrado al mercado; sin embargo, de las 700 especies de HEP actualmente conocidos, sólo 10 especies han sido empleadas para el control biológico, quedando un número importante con potencial para su aplicación (Hajek y St. Leger, 1994; St. Leger y col., 1996; Pucheta-Díaz y col., 2006). La mayor limitación en el desarrollo de micoinsecticidas, comparado con insecticidas químicos, es el hecho de que estos requieren mayor tiempo después de la aplicación para el control del insecto, durante el cual los insectos infectados pueden causar serios daños a los cultivos (St. Leger y col., 1996).

## FACTORES ABIÓTICOS Y BIÓTICOS

Existen una gran variedad de factores abióticos y bióticos que afectan la estabilidad y persistencia de los HEP en el suelo (Apperson y col., 1992). Entre los **factores abióticos** que afectan la viabilidad y persistencia de los HEP en el campo, se encuentran los rayos ultravioleta, la temperatura, la humedad relativa y los fungicidas (Hajek y St. Leger, 1994; Pucheta-Díaz y col., 2006). **La temperatura** debe ser considerada como un punto de partida para la selección de cepas con potencial para el control biológico. Este factor ambiental es relevante para la eficacia de agentes microbianos fúngicos por incidir en su crecimiento vegetativo y persistencia en

el campo (Luz y Fargues, 1997). Se ha reportado la tasa de crecimiento a diferentes temperaturas, para la selección de aislados de *Lecanicidium lecanii* cuando se utiliza como control biológico, siendo decisiva no sólo para su crecimiento, sino también para la esporulación y germinación de conidios y la tasa de invasión (Ayala-Zermeño y col., 2005). **La humedad relativa (HR)** es otro factor abiótico clave en el potencial de los HEP. Usualmente, la germinación de la conidia ocurre en un rango de HR de 90%-100%. Sin embargo, se ha demostrado que las infecciones de varios insectos hospederos son posibles a diversos niveles de HR. Cuando el uso de los HEP es contra insectos de suelos cultivados, las condiciones de humedad o HR son de menor importancia, o incluso no la tienen. El micelio normalmente permanece en el suelo en una atmósfera de cerca del 99% de HR (Zimmermann, 1986). Los HEP que se aplican contra insectos plaga en la agricultura, también pueden ser afectados por agroquímicos, como los fungicidas, insecticidas, o herbicidas (Zimmermann, 1986). Por otro lado, las prácticas culturales también influyen en la densidad de propágulos de HEP en los agroecosistemas.

Entre los **factores bióticos** se deben mencionar las plantas hospederas, las cuales pueden interferir con los patógenos fúngicos directa o indirectamente por su influencia en los insectos hospederos. Los insectos herbívoros tienen una relación compleja con sus plantas hospederas. La variación entre plantas hospederas también puede afectar la relación entre herbívoros y sus enemigos naturales. El desarrollo de los patógenos fúngicos dentro de los hospederos, puede ser afectado no sólo por las reacciones de inmunidad de los hospederos (Feldhaar y Gross, 2008), sino también, indirectamente, por la composición del alimento del hospedero (Hajek y St. Leger, 1994).

### MODO DE INFECCIÓN DE LOS HEP

Los HEP inician su proceso infectivo en los insectos hospederos cuando las esporas viables son retenidas por contacto en la superficie del integumento, mientras encuentran un espacio propicio para establecer la asociación patógeno-hospedero e iniciar la formación del tubo germinativo. Es entonces, cuando el hongo inicia la excreción de enzimas hidrolíticas que van degradando la cutícula y proporcionando a su vez nutrientes al hongo (St. Leger y col., 1986b). Estas enzimas además de degradar la cutícula del insecto, coadyuvan con el proceso de penetración por presión mecánica iniciado por el apresorio, el cual es una estructura especializada formada en el tubo germinativo (López-Llorca y Claugher, 1990). El tubo germinativo rastrea y reconoce la superficie del insecto para la lo-

calización de sitios receptores, habilitando a la hifa para la penetración de la cutícula (Riquelme y col., 1998). El apresorio además de servir de anclaje de la espora, ejerce una presión hacia el interior del insecto (Pucheta-Díaz, 2006). Una vez dentro, el hongo desarrolla cuerpos hifales, los cuales se van diseminando a través del hemocele e invaden diversos tejidos musculares, cuerpos grasos, tubos de Malpighi y hemocitos, ocasionando la muerte del insecto, y una vez agotados muchos de los nutrientes, el hongo inicia un crecimiento micelial e invade todos los órganos del hospedero. Finalmente las hifas penetran la cutícula desde el interior del insecto y emergen a la superficie, donde en condiciones ambientales apropiadas inician la formación de nuevas esporas (Hajek y St. Leger, 1994; Pucheta-Díaz y col., 2006).

Como se describe anteriormente, estos HEP poseen un conjunto de mecanismos que les permite penetrar y asimilar los materiales del hospedero, y a la vez superar los mecanismos de resistencia. Diferentes metabolitos fúngicos ayudan al patógeno con aspectos físicos de ingreso. Las enzimas degradadoras de cutícula destruyen o modifican la integridad estructural del hospedero, inhiben sus procesos selectivos, e interfieren con su sistema regulatorio (Hajek y St. Leger, 1994). Cabe mencionar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa queda inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos de melanización, esclerotización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento (Pucheta-Díaz y col., 2006; Feldhaar y Gross, 2008). La mayoría de los tejidos bajo las estructuras cuticulares son inmunológicamente activos y pueden expresar efectores antimicrobianos, incluyendo varios péptidos y especies reactivas de oxígeno, permitiéndole una eficiente respuesta sistémica inmune (Feldharr y Gross, 2008).

Como se mencionó, las conidias son las unidades infectivas que penetran al cuerpo del insecto, produciéndole diferentes efectos a distintos niveles, pudiendo producir la muerte del insecto en un período de tres a cinco días, dependiendo de la virulencia del hongo y estadio del insecto. Por ende, las conidias inician la patogénesis en los HEP y son mediadores de la transmisión de enfermedades, sin embargo, de lo poco que se sabe acerca de los elementos genéticos que controlan la conidiación es que algunos genes específicos son controlados por la ruta de señalización mediada por proteínas G, la cual sensa las condiciones ambientales y regula el cambio entre el crecimiento vegetativo y la conidiación. La señalización a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G heterotrimérica (G $\alpha$ ), ha sido estudiada más ampliamente, que las mediadas

por las subunidades G $\beta$  y Gy. A pesar de que la señalización ocurre primeramente a través de la respuesta de la proteína cinasa A, vía AMPc (Shimizu y Keller 2001), también existen evidencias de respuestas independientes de AMPc (Ivey y col. 2002). La activación de la subunidad Ga conlleva a la proliferación de la hifa y a la falta de esporulación, mientras su delección acelera la conidiación (Chang y col., 2004), lo cual es indicativo de que la ruta mediada por proteínas G participa en la finalización de la conidiación y en la iniciación del crecimiento vegetativo.

### REGULADORES DE LA SEÑALIZACIÓN POR PROTEÍNAS G (RGS, Por sus siglas en Inglés)

La ruta de señalización RGS ha sido implicada en el control de diversas funciones celulares, incluyendo la conidiación en hongos filamentosos. El entendimiento del proceso regulatorio involucrado en la conidiación es esencial para poder desarrollar un hongo que sea efectivo como biocontrol. Los RGS interactúan con la subunidad Ga para incrementar la hidrólisis de GTP, llevando a la desactivación de Ga y a la terminación de la señalización por proteínas G (Chidiac y Roy, 2003). Igualmente se ha reportado que mutaciones por pérdida de la función en el gen *flbA* que codifica para los RGS en *A. nidulans*, lleva al bloqueo de la esporulación (Hicks y col. 1997). A parte de la conidiación, la ruta de señalización por proteínas G también ha sido implicada en la germinación, en la síntesis de toxinas, en la producción de pigmento y en la termotolerancia, en un buen número de hongos (Estruch, 2000; Shimizu y Keller 2001, Ivey y col., 2002, Chang y col., 2004; Han y col., 2004; Lafon y col., 2005).

A la fecha, se han identificado seis familias de proteínas RGS en *Aspergillus spp.* (ortólogos de RgsA, RgsB, RgsC, RgsD, FlbA y Gprk) y recientemente se caracterizó un gen *flbA* (el *cag8*) en el hongo *M. anisopliae* cuya delección resultó en la reducción de la producción de conidias, del crecimiento micelial, de la virulencia, de la pigmentación y de la síntesis de hidrofobina, lo que sugiere presumiblemente que esta cascada de señalización por proteínas G, está involucrada en todos estos procesos (Fang y col. 2007).

### FUNCIÓN DE ALGUNAS ENZIMAS HIDROLÍTICAS DURANTE LA INFECCIÓN

Está demostrado que la actividad entomopatógena de los hongos depende de su equipamiento enzimático, ya que para la penetración de la cutícula del insecto plaga, se requiere de la acción de enzimas hidrolíticas, encontrándose entre las más estudiadas: proteasas, quitinasas, lipasas, quitobiosas, lipooxigenasas

y otras enzimas hidrolíticas, que van degradando los componentes cuticulares importantes y proporcionan nutrientes para una mayor proliferación del hongo dentro del insecto (St. Leger y col., 1986b; Khan y col., 2003; Huang y col., 2004; Yang y col., 2007).

### ENZIMAS PROTEOLÍTICAS

Entre las enzimas proteolíticas, las serín proteasas son de un interés especial, debido a que se ha demostrado que se producen durante el primer paso de la infección (Tunlid y Jacksson, 1991). Entre las enzimas proteolíticas de hongos nematófagos y entomopatógenos que se han estudiado, se encuentran las serín proteasas extracelulares las cuales han sido aisladas y los genes que las codifican han sido clonados, facilitando su purificación y caracterización.

Hasta la fecha se han reportado las siguientes proteasas extracelulares de hongos: PII, Aoz1, VCP1, pSP-3, P32, Ver 112, PIP, PrA, Ds1, Pr1 y Pr2. De éstas, las serín proteasas de 32-39 kDa han sido caracterizadas, mostrando una amplia especificidad de sustrato (Yang y col., 2007). Por otro lado, estas enzimas, las serín proteasas extracelulares de diferentes hongos, han mostrado un alto grado de similitud entre sí, sugiriendo su posible procedencia de un ancestro común (Yang y col., 2007). Estudios con *M. anisopliae* demostraron claramente que la proteasa Pr1 (quimoelastasa extracelular) es el factor clave en la penetración de la cutícula del insecto por el hongo (St. Leger y col., 1988).

Otro ejemplo es el de *P. fumosoroseus* un hongo entomopatógeno de la mosquita blanca, ha sido exitosamente utilizado como agente de biocontrol (Mier y col., 2004). Castellanos-Moguel y col., (2007), realizaron pruebas de virulencia y de actividad extracelular de proteasas tipo subtilisina (Pr1) y tipo tripsina (Pr2), durante la producción de propágulos de aislados de *P. fumosoroseus* de mosquita blanca (Homoptera: Aleocharidae), encontrando que *P. fumosoroseus* (aislado EH-(506/3) es un buen candidato para el control biológico de la mosquita blanca en México, debido a su alta virulencia, elevada producción de Pr1 y su rápida transición a blastosporas en el medio líquido ensayado. Las serín proteasas Pr1 y Pr2 también han sido identificadas en *V. lecanii*, *Nomuraea rileyi* y *M. flavoviride* (López-Llorca y Robertson, 1992; Bidochka y Meltzer, 2000). Asimismo, han sido identificados y clonados los genes correspondientes a once isoformas de proteasas y una metaloproteasa, relacionadas al mecanismo de penetración del hongo *M. anisopliae* var. *Anisopliae* y var. *Acridum* (St. Leger y col., 1994).

La virulencia, patogenicidad, y agresividad son conceptos comunes en el lenguaje técnico propues-

to para los HEP; definiendo como virulencia al grado de patogenicidad con que un organismo mata a un hospedero específico en condiciones controladas, patogenicidad como la capacidad de un microorganismo para causar enfermedad y agresividad como la habilidad de un patógeno para invadir a su hospedero.

Indudablemente, muchas enzimas participantes en patogenicidad son importantes para determinar la virulencia. Sin embargo, las enzimas no son el único factor que influye en el fenómeno de la virulencia, o en el éxito del proceso de la infección, ya que existen muchos otros factores como son: el efecto de la nutrición, el crecimiento fúngico antes de la penetración, la temperatura óptima de crecimiento, la producción de esporas, la tolerancia a la radiación solar, la capacidad de adhesión de la conidia a la cutícula, la presencia de ácidos grasos en la superficie de ésta, la producción y la regulación de toxinas, entre otros factores. Un ejemplo de ello lo reportan Safavi y col., (2007) quienes observaron el efecto de la nutrición sobre el crecimiento y la virulencia del HEP *B. bassiana*, en algunos de los aislados sometidos a estrés osmótico, no pudiendo concluir la existencia de una relación entre la velocidad de germinación, la actividad de Pr1 y su virulencia. No obstante, en otro estudio se evaluaron 33 fuentes de carbono sobre 11 hongos como agentes de biocontrol, demostrando su papel en la germinación de la espora, en el crecimiento de la hifa y en la esporulación (Sun y Liu, 2006). Khan y col., (2003) demostraron la producción de una gran cantidad de enzimas, proteasas y quitinasas, inducidas en respuesta a nutrición, cuando *P. lilacius* fue expuesto a nematodos. Por lo tanto, se establece que esta proteasa es la principal proteína secretada en respuesta al cultivo de *P. lilacinus* en el medio ensayado. La proteasa purificada del sobrenadante del cultivo fue activa a pH alcalino y altamente susceptible a PMSF, un inhibidor específico de serin proteasas.

Por otra parte, se ha encontrado una relación entre la producción de amilasa y la virulencia, donde niveles elevados de amilasa se asocian con una hipervirulencia en *M. anisopliae*, y los aislados con deficiencia de esta enzima, no presentan virulencia (Hegedus y Khachatourians, 1995). Entre las enzimas hidrolíticas que están involucradas en la penetración de la cutícula, se encuentran también las quitinasas y las lipasas, las cuales forman parte de los factores determinantes de HEP (St Leger y col., 1991; Xiang y col., 2005).

## LIPASAS

Las lipasas han atraído la atención especialmente por su uso potencial en la biotecnología, debido a su disponibilidad y estabilidad. La producción de lipasa por un

HEP contribuye significativamente en la penetración y provisión de nutrientes *in vivo*. Las lipasas actúan sobre los lípidos antes que las quitinasas. Una vez que la superficie lipídica de la epicutícula es degradada por las lipasas, el hongo produce grandes cantidades de proteasas (Pr1), para degradar el material proteínico de la procutícula que se encuentra adherida como una cubierta de la quitina. Una vez liberadas las fibras de quitina, las proteínas solubilizadas son degradadas por aminopeptidasas y exopeptidasas, para ser convertidas en aminoácidos útiles como nutrientes para el hongo (Bidochka y col., 1997). Una vez degradada la cubierta de proteína, se facilita el acceso de las enzimas quitinolíticas hacia las fibras de quitina, lo cual induce a la producción de más quitina (GlcNAc), y ésta a su vez a la síntesis de más quitinasa (Hegedus y Khachatourians, 1995; Bidochka y col., 1997). Sólo a través de la acción coordinada y combinada de las tres principales enzimas hidrolíticas, (proteasa, quitinasa y lipasa) se puede llevar a cabo la desintegración completa de la cutícula (Hegedus y Khachatourians, 1995).

## QUITINASAS

La quitina, un homopolímero de  $\beta$ -(1,4) N-acetilglucosamina (GlcNAc), es el polímero biológico más abundante en la biosfera, después de la celulosa (Cohen-Kupiec, 1998), siendo el principal componente estructural en las paredes celulares de los hongos y de exoesqueletos de invertebrados (Warren, 1996). Existen tres tipos de quitina:  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . Las quitinasas hidrolizan las uniones  $\beta$ -(1,4) en la quitina, produciendo predominantemente N, N'-diacetilquitobiosa, la cual es posteriormente degradada por quitobiasas al monómero GlcNAc. A pesar de que la quitina no existe en la pared celular de las plantas, las quitinasas están ampliamente distribuidas en plantas, así como también en bacterias, hongos, insectos y vertebrados (Xiang y col., 2005). La principal función de estas enzimas es hidrolizar quitina; en el caso de los hongos esta enzima participa en la modificación de la morfogénesis de su pared celular (Sahai y Manocha, 1993). Estas enzimas modulan el crecimiento y la autólisis de paredes celulares de hongos que contienen quitina y también están involucradas en micoparasitismo (Lorito y col., 1998), así como en actividades de HEP y hongos nematófagos hacia sus hospederos (Tikhonov y col., 2002). En base a su similitud en la secuencia de aminoácidos hacia dos diferentes glicosil hidrolasas, todas las quitinasas caracterizadas hasta la fecha cuyos genes han sido clonados, fueron clasificadas en las familias 18 y 19 (Henrissat, 1991; Henrissat y Bairoch, 1993). La familia 18 contiene quitinasas de bacterias, hongos, virus, animales, y de plantas, clases III y V. La familia 19 contiene quitinasas de plantas clase I, II y IV (Sahai y Manocha, 1993).

Los HEP *M. anisopliae* y *B. bassiana* producen varias quitinasas (St. Leger y col., 1986; Kang y col., 1999) las cuales pueden tener una gran variedad de funciones. Algunas de ellas son importantes enzimas que participan en la degradación de la cutícula y actúan en forma coordinada con proteasas para hidrolizar la cutícula del insecto (St. Leger y col., 1986). *V. lecanii* produce quitinasas que son efectivas en la hidrólisis y destrucción del exoesqueleto de varios insectos, y esto hace que tenga un potencial como biocontrol en plagas de insectos (Liu y col., 2003; Lu y col., 2005). El uso de esporas de *V. lecanii* ha recibido gran atención en el control biológico de insectos y plagas, habiéndose encontrado que éste puede ser usado con la mezcla de algunos insecticidas o fungicidas para obtener un efecto potenciador en programas control integrado (Hall, 1981b). Xiang y col., (2005) encontraron dos secuencias, *chi1* y *chi2*, de *V. lecanii* pertenecientes a la familia 18 sobre la base de su similitud con la secuencia de aminoácidos de glicosil hidrolasas de otras quitinasas de hongos pertenecientes a esta familia. Asimismo, se ha reportado la identificación, purificación y caracterización de quitinasas de *P. lilacinus* encontradas tanto por isoelectroenfoque, como midiendo su actividad quitinolítica sobre geles en 2D (doble dimensión) (Khan y col., 2003).

## PRODUCCIÓN DE TOXINAS

Los HEP poseen además la capacidad de sintetizar toxinas que son utilizadas en el ciclo de las relaciones patógeno-hospedero. El estudio de estas toxinas (dextruxinas, demetildextruxina y protodextruxina) es de suma importancia ya que se pueden sintetizar productos químicos de baja toxicidad y de elevada acción insecticida, acaricida y nematocida. (Hall, 1981; Wang y col., 2005). Las toxinas son importantes para microorganismos parasíticos ya que facilitan la infección por debilitamiento del hospedero. Algunas especies de HEP son capaces de producir ácidos orgánicos y algunos de ellos han sido implicados en el proceso infeccioso. Por ejemplo, se ha reportado la producción de ácido oxálico por *Beauveria spp.*, *L. lecanii*, *P. fumosoroseus* y *M. anisopliae*. Este compuesto se ha sugerido como un elemento que coadyuva a la solubilización de la proteína cuticular (Pucheta-Díaz, 2006). El ácido dipicolínico, es otro compuesto importante producido por algunos hongos entomopatógenos entre los que destaca *Paecilomyces spp.*, (Asaff y col., 2006), el cual posee propiedades insecticidas contra larvas de *Calliphora erythrocephala* (Pucheta-Díaz, 2006). También se han reportado toxinas peptídicas cíclicas y lineales. A las cíclicas pertenece una familia de péptidos conocidos como depsi-péptidos. La beauvericina, que es el primer compuesto caracterizado perteneciente a esta familia y fue extraída inicialmente de *B. bassiana*, y posteriormente aisla-

da de diferentes especies de *Fusarium* y *Paecilomyces* (Logrieco y col., 1998; Pucheta-Díaz, 2006). Otros depéptidos son las eniatinas, aisladas de *Fusarium*, que son tóxicas contra larvas de *Choristoneura fumiferana* (Pucheta-Díaz, 2006). Otro metabolito aislado de *B. bassiana* y *L. lecanii*, conocido como basianólido, mostró tener una fuerte acción insecticida contra larvas de gusanos de seda *Bombix mori*. El HEP *M. anisopliae* produce toxinas llamadas dextruxinas que pueden matar insectos. No resulta entonces sorprendente que la producción de dextruxinas haya sido relacionada con patogenicidad de estos hongos (Kershaw y col., 1999). Las dextruxinas son los compuestos mejor caracterizados, ya que su modo de acción también inhibe la síntesis de ADN, ARN y de proteínas en las células de los insectos (Pucheta-Díaz, 2006). También se reporta que las dextruxinas son capaces de inhibir la secreción de fluidos por el tubo de Malpighi en *Schistocerca gregaria* (langosta) y que las dextruxinas A, B y E producidas por *M. anisopliae*, mostraron propiedades insecticidas al ser probadas en larvas de *Plutella xylostella*, así como en larvas y adultos de *Phaedon cochleariae*, produciendo un nivel de mortalidad alto en las poblaciones de insectos. Por otro lado, se ha demostrado que la producción de ácido acético por *P. lilacinus* inhibe nematodos juveniles (Djian y col., 1991), mientras que filtrados fúngicos de varios hongos crecidos en extracto de malta mostraron toxicidad contra estadios infecciosos juveniles y huevos (Chen y col., 2000).

## FORMULACIONES DESARROLLADAS

A nivel mundial numerosos grupos de investigadores y empresas productoras se concentran en el desarrollo de productos comerciales a partir de hongos, tanto en forma de gránulos, como de polvo hidratable. Entre estos productos se encuentran Biofox C (*F. oxysporium* y *F. moniliforme* SIAPA, Italia), Mycotol (*V. lecanii*, Koppert, Holanda), Mycotrol GH (*B. bassiana*, Mycotech), Green Muscle (*M. flavoviride*, CABI Bioscience UK), DiTera (*M. verrucaria*, Valent (Sumitomo), Japón) Bea-Sin (*B. bassiana*, Agrobiosa, Culiacán Sin.), BotaniGard (*B. bassiana*, Mycotech, México DF), Bio-Blast (*M. anisopliae*), Pea-Sin (*P. fumosoroseus*), PFR-97 (*P. fumosoroseus*), Fitosan-M (*M. anisopliae*, CES-AVEG, Irapuato, Gto.) y Bio-Fung (*B. bassiana*, CES-AVEG Irapuato, Gto.) entre otros productos (García de León y Mier, 2003; Xu y col., 2004).

## APLICACIÓN DE ALGUNOS MICOPLAGUICIDAS EN MÉXICO

Los HEP *M. anisopliae* y *M. anisopliae* var. *Acridum* (= *M. flavoviridae*) son utilizados para el control de plagas como el chapulín y la langosta que devastan enormes

extensiones de cultivos básicos como el maíz, trigo, frijol, caña de azúcar, algodón, soya, sorgo, henequén, alfalfa, frutales y pastizales en explotaciones pecuarias. También son efectivos en el control de la mosca pinta o salivazo de los pastos y la gallina ciega, coleóptero rizófago asociado al maíz y frijol (Hernández y col., 2000; García de León y Mier, 2003). *B. bassiana* es usado para el control de la broca del café, mosquita blanca en hortalizas y gallina ciega y chapulines en cultivos básicos (Hernández y col., 2000), mientras que *V. lecanii* y *P. fumosoroseus* son patógenos de la mosquita blanca y pulgones, plagas de cultivos como el frijol; hortalizas en general como el jitomate, chile, calabacita, pepino, berenjena, coliflor; cultivos de invernaderos y flores de ornato como la nochebuena y el crisantemo (Castellanos y col., 2003; Mier y col., 1991).

Para el manejo de la langosta *Schistocerca gregaria*, es necesario realizar su control básicamente en tres etapas: ninfas de la primera generación (Junio-Agosto), ninfas de la segunda generación (Septiembre-Noviembre) e imagos (Diciembre-Junio), con la finalidad de reducir sus poblaciones y evitar que se formen las mangas de adultos que son las que ocasionan los daños más fuertes. En las evaluaciones con HEP para el control de esta langosta en la Planicie Huasteca, los mejores resultados se han obtenido con el hongo *M. anisopliae* var. *acridum*, en concentraciones de  $1.2 \times 10^{12}$  conidias por hectárea, con efectividades hasta del 100% a los 10 días después de la aplicación. *M. anisopliae* var. *acridum* ha resultado más efectivo que los hongos *M. anisopliae* var. *anisopliae* y *Beauveria bassiana* (Garza UE, 1999).

## CONCLUSIONES

La utilización de HEP para el control biológico es una alternativa viable debido a la especificidad sobre sus huéspedes, baja o nula patogenicidad sobre la fauna benéfica, insectos nativos, mínima alteración del ecosistema, además de no afectar ni a los mamíferos ni a los peces. Para llevar a cabo programas de control de insectos con HEP, es necesario un buen conocimiento sobre la selección de aislados y técnicas de bioensayo, a fin de seleccionar razas patogénicas y virulentas adaptadas a condiciones ecológicas específicas.

Con la evolución de técnicas analíticas sofisticadas se acelerará la elucidación de los componentes clave en los procesos de infección, permitiendo la identificación de las señales que conectan los cambios entre los estados de saprotrofia-parasitismo, así como los procesos de infección a nivel molecular así como la identificación de los factores potenciales de virulencia.

La generación de nuevos productos de origen biológico deberá tener en cuenta la determinación de los medios de cultivo óptimos, así como la optimización del sistema para la obtención masiva de inóculo, que permita una buena relación costo-beneficio en su producción. Se deberán establecer primero ensayos de producción a pequeña escala, para determinar la estabilidad del producto y las condiciones de almacenamiento, así como llevar a cabo bioensayos de laboratorio, invernadero y campo, que confirmen la efectividad del producto una vez formulado.

El uso de agentes de control biológico, como son los enemigos naturales y los entomopatógenos, está empezando a asumir un papel importante en el campo, siendo considerable el número de casos exitosos, lo que los coloca como una de las opciones de control importante para el desarrollo de una agricultura sustentable. Sin embargo, aún falta profundizar más en el entendimiento de las bases moleculares, relacionados con la capacidad de los entomopatógenos para regular las poblaciones de insectos plaga. Esto es de trascendental importancia para poder lograr una planeación de estrategias de control adecuadas. Por último, se espera que la aplicación adecuada de biocontroladores, así como de otros métodos alternativos, permita disminuir las pérdidas de las cosechas, además de contribuir a la disminución de los procesos de contaminación del medio ambiente.

## BIBLIOGRAFÍA

- Apperson CS, Federici BA, Tarver FR, Stewart W (1992) Biotic and abiotic parameters associated with an apizootic of *Coelomomyces punctatus* in a larval population of the mosquito *Anopheles quadrimaculatus*. *J Invertebr Pathol* 60: 219-228.
- Asaff TA, Reyes VY, López LVE, De la Torre MM (2002) Guerra entre insectos y microorganismos: una estrategia natural para el control de plagas. *Avance y Perspectiva*, México 21: 291-295.
- Asaff TA, Cerda-García-Rojas C, Viniegra-González G, De la Torre MM (2006) Carbon distribution and redirection of metabolites in *P. fumosoroseus* during solid-state and liquid fermentations. *Process Biochem* 41: 1303-1310.
- Ayala-Zermeño MG, Mier T, Sánchez-Robles J, Toriello C (2005) Variabilidad intraespecífica del crecimiento de *L. lecanii* (= *V. lecanii*) por efecto de la temperatura. *Rev Mex Mic* 20: 93-97.
- Bidochka MJ, St. Leger RJ, Roberts DW (1997) Mechanism of deuteromycete fungal infection in grasshoppers and locust: An overview. *Memories Entomol Soc Canada*. 171: 213-224.
- Bidochka MJ, Meltzer MJ (2000) Genetic polymorphisms in three subtilisin-like protease isoforms (Pr1, Pr1B, and PrC) from *Metarhizium strains*. *Can J Microbiol* 46: 1138-1144.



- Castellanos-Moguel J, Mier T, Reyes-Montes MR, Toriello C (2003) Comparación de la virulencia de aislados de *P. fumosoroseus* (Ascomycota mitospórico) de México hacia la mosquita blanca por el índice de crecimiento fúngico. XXVI Congreso Nacional de Control Biológico. Soc. Mex. *Control. Biol.*, México., pp. 105-108.
- Castellanos-Moguel J, González-Barajas M, Mier T, Reyes-Montes MR, Aranda E, Toriello C (2007) Virulence testing and extracellular subtilisin-like (Pr1) and trypsin-like (Pr2) activity during propagule production of *P. fumosoroseus* isolates from whiteflies (Homoptera: *Aleyrodidae*). *Rev Iberoam Micol* 24: 62-68.
- Chang MH, Chae KS, Han DM, Jahng KY (2004) The GanB G $\gamma$ -protein negatively regulates asexual sporulation and plays a positive role in conidial germination in *A. nidulans*. *Genetics* 167: 1305-1315.
- Chen SY, Dickson DW, Mitchell DJ (2000) Viability of Heterodera glycine exposed to fungal filtrates. *J. Nematol* 32: 190-197.
- Chidiac P, Roy AA (2003) Activity, regulation, and intracellular localization of RGS proteins. *Receptors Channels* 9: 135-147.
- Cohen-Kupiec R, Chet I (1998) The molecular biology of chitin digestion. *Curr Opin Biotechnol* 9: 270-277.
- Djian C, Pijarowski L, Ponchet M, Arpin N, Favrebonvin J (1991) Acetic-acid- a selective nematocidal metabolite from culture filtrates of *P. lilacinus* (Thom) Samson and *T. longibrachiatum* Rifai. *Nematológica* 37: 101-112.
- Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Lett* 24: 469-486.
- Fang W, Pei Y, Bidochka MJ (2007) A regulator of a G protein signalling (RGS) gene *cag8* from the insect pathogenic fungus, *M. anisopliae* is involved in conidiation, virulence and hydrofobin synthesis. *Microbiol* 153: 1017-1025.
- Feldhaar H, Gross R (2008) Immune reactions of insects on bacterial pathogens and mutualist. *Microb infect* xx : 1-7. Article in press
- Feng MG, Poprawski TJ, Khachatourians GG (1994) Production, formulation and application of the entomopathogenic fungus *B. bassiana* for insect control. *Curr Status Rev Biocontrol Sci Technol* 4: 3-34.
- Garza, UE (1999) Evaluación de insecticidas para el control de la langosta *Schistocerca gregaria* Walker en la Planicie Huasteca. Informe Técnico Campo Experimental Ébano. SAGARPA. INIFAP-CIRNE. (Circulación Interna).
- García de León S, Mier T (2003) Panorama actual de la producción comercial y aplicación de bioplaguicidas en México. *Soc Rur Prod Medio Amb* 4: 65-81.
- Hajek AE, St Leger RJ (1994) Interactions between fungal pathogens and insect host. *Annu Rev Entomol* 39: 293-322.
- Hall R (1981) Laboratory studies on the effect of fungicides, acaricides and insecticides on the entomopathogenic fungus, *V. lecanii*. *Entomol Exper Applic* 29: 39-48.
- Hall RA (1981b) The fungus *V. lecanii* as a microbial insecticide against aphids and scales. In Burges HD (ed.): *Microbial Control of Pets and Plant Diseases*. Academic Press, London, pp. 483-498.
- Han KH, Seo JA y Yu JH (2004) Regulators of G-protein signalling in *A. nidulans*. RgsA downregulates stress response and stimulates asexual sporulation through attenuation of GanB (Galpha) signalling. *Mol Microbiol* 53: 523-540.
- Hegedus D, Khachatourians G (1995) The impact of biotechnology on hypomycelious fungal insect biocontrol agents. *Biotechnol Adv* 13: 455-490.
- Henrissat B (1991) A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 280: 309-316.
- Henrissat B, Bairoch A (1993) New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 293: 781-788.
- Hernández VVM., Berlanga PAM, Barrientos LL (2000) Vegetable and mineral oil formulations of *M. anisopliae* var. *acidum* to the control the central american locus (*Schistocerca piceifrons piceifrons* Walker) (Orthoptera: Acrididae). *J Orthoptera Res*, 9:223-227.
- Hicks JK, Yu JH, Keller NP, Adams TH (1997) *Aspergillus* sporulation and mycotoxin production both require inactivation of the FadA G $\alpha$  protein-dependent signalling pathway. *EMBO J* 16: 4916-4923.
- Huang XW, Zhao NH, Zhang KQ (2004) Extracellular enzymes serving as virulence factors in nematophagous fungi involved in infection of the host. *Res Microbiol* 155: 811-816.
- Ivey FD, Kays AM, Borkovich KA (2002) Shared and independent roles for a G $\alpha$  protein and adenylyl cyclase in regulating development and stress responses in *N. crassa*. *Eukaryot Cell* 1: 634-642.
- Jackson MA, McGuire MR, Lacey LA, Wraight SP (1997) Liquid culture production of desiccation tolerant blastospores of the bioinsecticidal fungus *P. fumosoroseus*. *Mycol Res* 101: 35-41.
- Kang SC, Park S, Lee DG (1999) Purification and characterization of a novel chitinase from the entomopathogenic fungus, *M. anisopliae*. *J Invertebr Pathol* 73: 276-281.
- Kershaw MJ, Moorhouse RE, Bateman R, Reynolds ES, Charnley KA (1999) The role of destruxins in the pathogenicity of *M. anisopliae* for three species of insects. *J Invertebr Pathol* 74: 213-223.
- Khan A, Williams KL, Molloy MP, Nevalainen H (2003) Purification and characterization of a serine protease and chitinases from *P. lilacinus* and detection of chitinase activity on 2D gels. *Protein Expr Purif* 32: 210-220.
- Lafon A, Seo JA, Han KH, Yu JH, d'Enfert C (2005) The heterotrimeric G-protein GanB( $\alpha$ )-Sfa( $\alpha$ )-GpgA( $\gamma$ ) is a carbon source sensor involved in early cAMP-dependent germination in *A. nidulans*. *Genetics* 171: 71-80.
- Liu BL, Kao PM, Tzeng YM, Feng KC (2003) Production of chitinase from *V. lecanii* F091 using submerged fermentation. *Enzyme Microb Technol* 33: 410-415.
- Logrieco A, Moretti A, Castella G, Kosteci M, Golinsky P, Ritieni A, Chelhowski J (1998) Beauvericin production by *Fusarium* Species. *Appl Env Microbiol* 64: 3084-3088.
- López-Llorca LV, Claugher D (1990) Appresoria of the nematophagous fungus *V. suchlasporium*. *Micron Microsc Acta* 21: 125-130.
- López-Llorca LV, Robertson WM (1992) Immunocytochemical localization of a 32 kDa protease from the nematophagous fungus *V. suchlasporium* in infected nematode eggs. *Exp Mycol* 16: 261-267.
- Lorito M., Woo SL, García FI, Colucci G, Harman GE, Pintor-Toro JA, Filippone E, Muccifora S, Lawrence CB, Zoina A, Tuzun S, Scala F (1998) Genes from mycoparasitic fungi as a source for improving plant resistance to fungal pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 7860-7865

- Lu ZX, Laroche A, Huang HC (2005) Isolation and characterization of chitinases from *V. lecanii*. *Can J Microbiol* 51: 1045-1055.
- Luz C, Fargues J (1997) Temperature and moisture requirements for conidial germination of an isolate of *B. bassiana*, pathogenic to *R. prolixus*. *Mycopathol* 138: 117-125.
- Mier T, Rivera F, Bermúdez JC, Domínguez Y, Benavides C, Ulloa M (1991) Primer reporte en México del aislamiento de *V. lecanii* a partir de la mosquita blanca y pruebas de patogenicidad in vitro sobre este insecto. *Rev Mex Mic* 7:149-156.
- Mier T, Catellanos MJ, García GK, Ayala ZM, Fernández VV, Toriello C (2004) Valoración de hongos entomopatógenos para el control de plagas agrícolas. *Soc Rur Prod Medio Amb* 8: 57-67.
- Pucheta-Díaz M, Flores-Macias A, Rodríguez Navarro S, De la Torre MM (2006) Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. *Interciencia* 31: 856-860.
- Restrepo, I (1988) *Naturaleza Muerta. Los Plaguicidas en México*. Ed. Oceano. México.
- Riquelme M, Reynaga PCG, Gires G, Bartnicki GS (1998) What determines Growth Direction in Fungal Hyphae?. *Fungal Genet Biol* 24: 101-109.
- Saad, I. (1999). *Cuaderno de vigilancia tecnológica No. 6: «Cereales»*. (Solleiro, J. y Castañón, Rorario. eds.). México, CamBioTec, Instituto de Ingeniería, UNAM. 171 pág 13.
- Safavi SA, Shah FA, Pakdel AK, Rasoulían RG, Bandani RA, Butt MT (2007) Effect of nutrition on growth and virulence of the entomopathogenic fungus *B. bassiana*. *FEMS Microbiol Lett* 270: 116-123.
- Sahai AS, Manocha MS (1993) Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. *FEMS Microbiol Rev* 11: 317-338.
- Shimizu K, Keller NP (2001) Genetic involvement of a cAMP-dependent protein kinase in a G protein signalling pathway regulation morphological transition in *A. nidulans*. *Genetics* 157: 591-600.
- Stuart CF, Walker BH, Hobbs RJ, Hooper OU, Lawton JH, Sala OE, Tilman O (1997) Biotic control over the functioning of ecosystems. *Science*, 277: 500-503.
- St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AJ (1986) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: regulation of production of chitinolytic enzymes. *J Gen Microbiol* 132: 1509-1517.
- St. Leger R, Charney A, Cooper R (1986b) Cuticle-degrading enzymes of entomopathogen fungi: mechanisms of interaction between pathogen enzymes and insect cuticle. *J. Invertbr Pathol* 47: 295-302.
- St. Leger RJ, Durrands PK, Charnley AK, Cooper RM (1988) Regulation of production of proteolytic enzymes by the entomopathogen *M. anisopliae*. *Arch Microbiol* 150: 413-416.
- St. Leger RJ, Cooper RM, Charnley AK (1991) Characterization of chitinase and chitobiose produced by the entomopathogenic fungus *M. anisopliae*. *J. Invertebr Pathol* 58: 415-426.
- St. Leger R, Bidochke M, Roberts D (1994) Isoforms of the cuticle degrading Pr1 proteinase and production of a metalloproteinase by *M. anisopliae*. *Arch Biochem and Biophys* 313: 1-7.
- St. Leger RJ, Joshi L, Bidochka MJ, Roberts DW (1996) Construction of an improved mycoinsecticide overexpressing a toxic protease. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 6349-6354.
- Sun MH, Liu XZ (2006) Carbon requirements of some entomopathogenic and mycoparasitic Hyphomycetes as fungal biocontrol agents. *Mycopathol* 161: 295-305.
- Tikhonov VE, Lopez-Llorca LV, Salinas J, Jansson HB (2002) Purification and characterization of chitinases from the nematophagous fungi *V. chlamydosporium* and *V. suchlasporium*. *Fungal Genet Biol* 35: 67-78.
- Tunlid A, Jansson S (1991) Proteases and their involvement in the infection and immobilization of nematodes by the nematophagous fungus *Arthrobotrys oligospora*. *Appl Environ Microbiol* 57: 2868-2872.
- Waage, JK (1991) Biodiversity as a resource for biological control. En Hawksworth, D.L., (edit.), *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture*. C.A.B. International, U.K., pp. 149-163.
- Wang L, Huang J, You M, Guan X, Liu B (2005) Effects of toxins from two strains of *V. lecanii* (Hypomycetes) on bioattributes of predatory ladybeetle, *Delphastus catalinae* (Col. Coccinellidae). *J Appl Entomol* 129: 32-38.
- Warren RAJ (1996) Microbial hydrolysis of polysaccharides. *Annu Rev Microbiol* 50: 183-212.
- Xiang Lu, Laroche A, Huang HC (2005) Isolation and characterization of chitinases from *V. lecanii*. *Can J Microbiol* 51: 1045-1055.
- Xu CK, Mo MH, Zhang KQ (2004) Soil volatile fungistasis and volatile fungistatic compounds. *Soil Biol Biochem* 36: 1997-2004.
- Yang J, Tian B, Liang L, Zhang KQ (2007) Extracellular enzymes and the pathogenesis of nematophagous fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 75: 21-31.
- Zimmermann G (1986) Insect pathogenic fungi as pest control agents. En: *Biological Plant and Health Protection*. (Franz, J. M., Ed.) G. Fischer Verlag, Stuttgart pp. 217- 231.