

PRODUCTOS MICROBIANOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS: REVISIÓN DE CONCEPTOS Y EJEMPLOS DE APLICACIONES

Carlos E. Rolz Asturias, Luis Roberto de León & María del Carmen Samayoa

Resumen

Se presenta una revisión de una lista selectiva de referencias sobre los productos microbianos para el control de plagas o PCMPs. Como ejemplos se presentan dos casos específicos con resultados experimentales propios a) el empleo del compost como un soporte para un producto fúngico encapsulado y b) el uso de hongos de podredumbre parda como sustituto del fumigante del suelo más empleado comercialmente en la actualidad que es el bromuro de metilo.

Abstract

A selective literature review regarding microbial biomass products designed for pest control has been carried out and is presented and discussed. Experimental results of two specific cases follow: a) the use of compost as a support for a fungal encapsulated product and b) the use of brown rot filamentous fungi as natural sources of methyl halides.

Introducción

Las enfermedades y plagas de plantas de interés comercial causadas por organismos patógenos se hicieron presentes desde la invención de la agricultura por el ser humano, aproximadamente hace 10,000 años, actividad que le permitió asegurarse el sustento diario y que se considera un avance en el desarrollo de la humanidad (Stuckenbrok & McDonald, 2008). Sin embargo, pareciera que algunos patógenos se han hecho evidentes recientemente por mecanismos inherentes de la evolución, como la transferencia horizontal de genes o la hibridación, fenómenos que ocurren con frecuencia en los microorganismos. Los organismos patógenos representan un riesgo significativo a los planes y acciones que en la actualidad buscan asegurar una seguridad alimentaria en forma sostenible. Se estima que un 10 % de las cosechas a nivel mundial se pierden por causa del ataque de las plagas en el campo de cultivo (Strange & Scout, 2005).

Los productos microbianos para el control de plagas o PMCPs son una alternativa disponible para el control de plagas en la agricultura. Recientemente se ha mostrado más interés comercial por estos productos, aprovechando el conocimiento generado por la academia, en donde el tema ha mantenido prioridad, y la experiencia de la industria para producir y llevar un producto en forma adecuada y que fácilmente se incorpore a la tecnología agrícola del campo. El interés comercial se ha dado por la creciente actividad reguladora hacia los plaguicidas sintéticos, muchos de ellos moléculas persistentes y recalcitrantes en el medio ambiente y con una toxicidad demostrada en el ser humano.

En este artículo se hace primero una revisión de conceptos utilizando una lista selectiva de referencias. Luego se interroga sobre el PCMP natural, o compost, y lo informado en la literatura sobre su empleo para constituir suelos que muestren una resistencia a patógenos. Luego se presentan dos casos específicos con resultados experimentales propios a) el empleo del compost como un soporte para un producto fúngico encapsulado y b) el uso de hongos de podredumbre parda como sustituto del fumigante del suelo más empleado comercialmente en la actualidad que es el bromuro de metilo.

PRODUCTOS MICROBIANOS PARA EL CONTROL DE PLAGAS (PMCPs)

Se ha hecho una cantidad apreciable de trabajo básico y aplicado para desarrollar productos comerciales de naturaleza microbiana que contribuyan al control de las plagas que afectan a las plantas (El-Ghaouth 1997; Froyd 1997; Schisler and Slininger 1997; Mathre, Cook et al. 1999; Emmert & Handelsman, 1999; Harman 2000; Navon, 2000; van Lenteren, 2000; Lacey & Frutos, 2001; Gan-Mor & Mathews, 2003; Punja and Uthkhe 2003; Schisler and Slininger 2004, Compant, Duffy et al. 2005; Stiling, 2005; Brar & Verma, 2006; Crickmore 2006; El-Bendary, 2006; Hynes and Boyetchko 2006; Douglas

(2007); Roh et al., 2007; Verma, Brar et al. 2007; Whetstone and Hammock 2007; Zimmermann, 2007; Chandler, Davidson et al., 2008; Vallet-Gely et al. 2008;). Sin embargo, son pocos los productos que han llegado a la etapa comercial. Algunos creen, desde un punto de vista académico, que la principal razón es que no se ha logrado superar todavía la respuesta inconsistente e irregular en la práctica de los productos microbianos para el control de plagas o PMCPs. También se han mencionado, la falta de conocimiento básico de cómo funcionan los posibles mecanismos de control, las características

propias del proceso de manufactura del producto y su presentación final para su uso y las posibles interacciones con la flora microbiana natural del suelo. Otros, desde un punto de vista netamente comercial, opinan que el principal problema es la falta de experiencia en convertir una tecnología que ha funcionado en las condiciones establecidas en los laboratorios, a un producto comercial que funcione en los campos agrícolas. Esta última actividad requiere no sólo de la experiencia industrial, sino de recursos económicos disponibles durante varios años con el objeto de obtener datos experimentales necesarios que, por un lado,

demuestren fehacientemente que el producto funciona para lo que fue concebido, y por el otro, que cumpla con las regulaciones existentes para este tipo de productos. Los dos grupos de opinión coinciden, sin embargo, en resaltar el potencial que este tipo de productos podría llegar a tener

debido a los riesgos de salud y ambientales inherentes en el empleo de plaguicidas químicos. También los PMCPs han sido considerados como parte integral de los componentes biológicos tradicionales que forman parte de programas del manejo integrado de plagas (Morales, 2002).

Las técnicas de biología molecular se están aplicando en las investigaciones y se ofrecen alternativas interesantes y prometedoras (ver viñeta).

VIÑETA:

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE AGENTES MICROBIANOS DE BIOCONTROL
Mónica Stein

La Modificación Genética:

La modificación genética es una práctica antigua, originada al momento que el hombre comenzó a seleccionar los mejores especímenes de un organismo para su reproducción. El redescubrimiento de las teorías de heredabilidad de Mendel, de la estructura del ADN, y la revolución de la biología molecular del siglo pasado resultaron en una nueva era de modificación genética, realizada con métodos de ADN recombinante e ingeniería genética de especies. La ingeniería genética, o transformación, consiste en insertar de manera dirigida segmentos de ADN conocidos de un organismo a otro organismo. Existen distintos métodos de transformación genética: mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, por bombardeo biolístico, electroporación, utilización de virus, Integración Mediada por Enzimas de Restricción (REMI) o asimilación de ADN por ingestión o exposición (Tzifra y Citovsky, 2006; Chung et al., 2005; Praitis, 2006). Aplicada, comercialmente en bacterias, plantas y hongos para producción comercial de fármacos y otros productos, mejoramiento de especies agrícolas, y mejoramiento de procesos industriales, la ingeniería genética tiene, adicionalmente, el potencial de ser utilizada para el mejoramiento de especies para usos diversos, incluyendo microorganismos especializados para el control de enfermedades de plantas. A continuación se presentan algunos ejemplos de agentes de biocontrol que han sido modificados en el laboratorio con métodos de ingeniería genética.

Algunos ejemplos de modificación genética de agentes de biocontrol		
Organismo	Modificación	Referencias
Bacterias: <i>Bacillus thuringiensis</i> : Agente tradicional de biocontrol en suelos, que contiene la toxina Cry que afecta ciertos insectos	Se ha transformado con quitinasas y variantes del gen Cry, para adicionar otros niveles de biocontrol a su acción	Casique-Arroyo et al., 2007 Liu et al., 2009 Kramer y Muthukrishnan, 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i> : Bacteria epifítica asociada a la mayoría de plantas, presente en follajes y suelos	Se le han transformado toxinas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para que éstas sean expresadas en las partes aéreas de la caña.	Haas y Défago, 2006 Downing et al., 2000
<i>Rhizobium spp.</i> : Bacteria simbiótica que, por las ventajas que ofrece al brindar micronutrientes a la planta, se desea utilizar como portador de agentes de biocontrol	La genética y modo de acción de estas especies han sido ampliamente estudiadas. Actualmente se trabaja en métodos de transformación.	Bloemberg y Lugtenberg, 2001
Hongos: <i>Metarhizium anisopliae</i> : Hongo entomopatógeno utilizado comúnmente en biocontrol de insectos que afectan caña, termitas, mosquitos y otros	Se ha logrado transformar a través de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> y bombardeo para contener genes de quitinasas, resistencias a herbicidas y GFP como prueba de concepto.	Cao et al., 2007 Fang y Bidochka, 2006
<i>Trichoderma spp.</i> : Hongo micoparásito, que se asocia a una amplia gama de plantas (ej. Maíz y Arabidopsis) y está secuenciado.	Se ha logrado transformar a través de Integración Mediada por Enzimas de Restricción y electroporación bombardeo para contener resistencia a herbicidas, GFP, quitinasas y glucanasas como prueba de concepto.	Weaver y Kenerley, 2008 Liu et al., 2008 Benítez et al., 2000
<i>Beauveria bassiana</i> : Hongo entomopatógeno que causa la enfermedad blanca de la muscardina, afectando orugas, mosca blanca, áfidos, escarabajos y otros.	Se ha logrado transformar a través de REMI, <i>Agrobacterium</i> y electroporación bombardeo para contener resistencia a herbicidas como prueba de concepto.	Jiang et al., 2007 Fang et al., 2004
<i>Pseudozyma flocculosa</i> : Hongo micoparásito efectivo ante el moho polvoriento	Se ha transformado genéticamente para generar mutaciones e identificar su modo de acción. Esto abre la puerta a la modificación genética.	Cheng et al., 2003
<i>Candida oleophila</i> : Levadura utilizada para prevenir el crecimiento de hongos de podredumbre en frutales y ornamentales	Se ha aplicado electroporación y transformación química con genes de resistencia a antibióticos como prueba de concepto.	Yehuda et al., 2001.

Los PMCPs deben satisfacer los tres criterios siguientes, o por lo menos alguno de ellos: i) una efectiva colonización de la rizósfera, ii) una estimulación de las defensas de la planta, ya sea por una resistencia sistémica inducida (RIS), o por una resistencia sistémica adquirida (RSA), y iii) efectos antagonistas directos sobre el patógeno, sea a través de competencia por sustratos, parasitismo, antibiosis o por la inactivación o bloqueo de factores virulentos producidos por el patógeno.

Una alta proporción de los PMCPs comerciales están protegidos por patentes y en muchos casos no se conocen detalles de su formulación (Montesinos 2003). Este autor enfatiza la necesidad de desarrollar metodologías para el almacenamiento y preservación de los PMCPs. Asimismo, recomienda poner atención a la adición de aditivos bio-compatibles a la formulación final del producto, entre ellos los humectantes y dispersantes, los agentes protectores de la UV solar y los nutrientes. Un directorio de PMCPs comerciales está disponible.¹

El compost: ¿Un PMCB natural?

Una de las interesantes propiedades del compost se refiere a la relativamente reciente observación experimental de que la adición de compost al suelo puede prevenir algunas enfermedades de las plantas provocadas por microorganismos fitopatógenos (Hoitink, Krause et al. 2001). La evidencia hasta ahora indica que esta actividad biológica está asociada, y es debida, a la población microbiana presente en el compost, y/o previamente establecida en el suelo, pero favorecida por la adición del compost (Mazzola 2004; Noble and Coventry 2005). No se descarta tampoco, porque existe evidencia experimental, que existan en la población microbiana, hiperparásitos como especies de *Trichoderma* que también pueden producir resistencia inducida (Verma, Brar et al. 2007). En realidad el concepto de asociar al compost la característica de prevención de enfermedades de las plantas, se encuentra hoy en día más generalizada al suelo. Los suelos activos tienen, de acuerdo a algunas opiniones, un potencial considerable para combatir a los patógenos de las plantas, y dicha propiedad está asociada a la presencia de microorganismos causantes de la prevención (Borneman and Becker 2007).

Entre algunos de los resultados experimentales de prevención de enfermedades causadas por hongos están, el daño al talluelo observado en semillas de ornamentales, frutas y hortalizas, generalmente causado por *Phythium* spp., *Phytophthora* spp., y *Rhizoctonia* spp. (Aryantha, Cross et al. 2000; Fichtner, Benson et al. 2004; Scheuerell, Sullivan et al. 2005; Chae, Jin et al. 2006). También, la marchitez y la podredumbre de la corona y las raíces del tomate causado por *Fusarium* spp. (Borrero, Trillas et al. 2004) y la podredumbre de la raíz, en fresas, melones y pepinos (Kannangara, Uthkhe et al. 2004; Millner, Ringer et al. 2004; Suarez-Estrella, Vargas-García et al. 2007; Santos, Diane et al., 2008). Además, se ha observado al adicionar compost una reducción del nemátodo *Meloidogyne javanica* (Raviv, Oka et al. 2005).

Se ha sugerido usar el compost que presente la propiedad de prevención de enfermedades como un sustituto del fumigante gaseoso bromuro de metilo, debido a los problemas ambientales que dicho producto presenta (Ceuster

and Hoitink 1999; Trillas 2002). Se ha planteado la posibilidad de usar un extracto acuoso del compost, denominado *compost tea* como un aditivo líquido al suelo, tanto como tal, o como un producto aireado con el objeto de incrementar la biomasa microbiana beneficiosa del mismo (Scheuerell and Mahaffee 2005; Chae, Jin et al. 2006; Ozer and Koycu 2006).

Otra alternativa que existe para lograr el efecto de prevención, es la de agregar al compost, protegido de alguna forma, un inóculo de biomasa microbiana con las propiedades biológicas adecuadas. Es decir, emplear al compost como un soporte para un producto microbiano.

Ejemplo 1: PMCB Encapsulado de origen fúngico

El alginato de sodio es un polímero usado comúnmente para encapsular biomasa microbiana y ha funcionado adecuadamente en pruebas con PMCBs (Fravel, Marois et al. 1985; Lewis and Papavizas 1985; Papavizas, Fravel et al. 1988; Weidemann 1988; Knudsen and Bin 1990; Winder, Wheeler et al. 2003; Russo, Basaglia et al. 2005). La cápsula de alginato ha mostrado características que la hacen promisoría en su posible aplicación comercial: i) una estabilidad y una biodegradabilidad aceptables, ii) una porosidad que permite el transporte de macromoléculas hacia el exterior, y iii) un micro-ambiente relativamente inerte. Las diferentes especies del hongo *Trichoderma* spp. han demostrado una interacción con las raíces de las plantas que frecuentemente se traduce en (Harman, Howell et al. 2004): i) la inhibición del crecimiento de microorganismos patógenos para las plantas, ii) la inducción de una resistencia sistémica (RIS), iii) la estimulación del crecimiento de la raíz, la asimilación de nutrientes del suelo, una mayor resistencia a estrés abiótico y como resultado un aumento en la productividad. Como resultado, no es de extrañar que este género de hongos sea el más empleado en los PMCBs de origen fúngico (Harman 2000; Howell 2003; Verma, Brar et al. 2007). Conviene resaltar que se ha reportado en la literatura con anterioridad el empleo del compost como un soporte para el inóculo de *Trichoderma* spp. que funcione como PMCB (Hutchinson 1999; Heraux, Hallet et al. 2005; Héaux, Hallett et al. 2005).

Ensayos preliminares de encapsulado

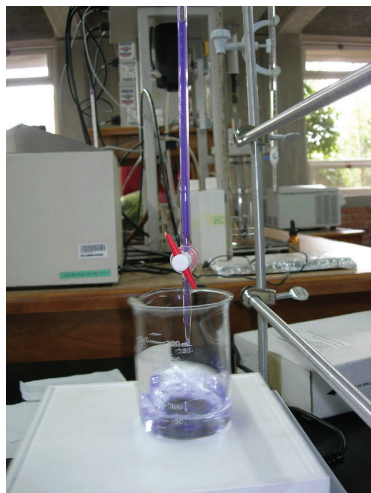
En las pruebas de preparación de cápsulas y de la estimación preliminar de la actividad biológica contra microorganismos patógenos de plantas, se utilizó el hongo *Trichoderma hamatum* 101530 obtenido del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Países Bajos. El hongo creció por 3 días en caldo Sabouraud en frascos erlenmeyer de 250 mL bajo una agitación de 125 rpm y a 27 °C, lográndose un crecimiento abundantemente y homogéneo del micelio como se observa en la Figura 1. El peso seco alcanzado fue de 6.32 g por litro que se consideró adecuado para los propósitos del estudio.

Se midieron 10 mL del frasco y se adicionaron a una solución de alginato de sodio (1.5 %). La suspensión se dejó gotear, con una bureta de 10 mL, ver Figura 2, o con una jeringa de 3 mL con aguja fina operada manualmente,

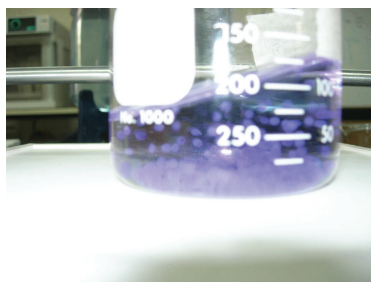
¹ Directory of Microbial Pesticides for Agricultural Crops in OECD countries.



► **Figura 1.**
Crecimiento de *Trichoderma hamatum* en medio líquido.



► **Figura 2.**
Formación de cápsulas por goteo.



► **Figura 3.**
Cápsulas en suspensión de una solución de cloruro de calcio.

en un frasco de vidrio de 300 mL, levemente agitado por una mesa agitadora (Roto Mix Type 50800, Barnstead/Thermolyne) conteniendo una solución de cloruro de calcio al 1.5%, ver Figura 3. El color de las cápsulas se debe a la adición de un colorante con el fin de visualizar mejor el tamaño de las mismas.

Al emplear la bureta el diámetro de las cápsulas obtenidas fue de aproximadamente 3 mm. Al emplear la jeringa para formar las gotas, el diámetro de las cápsulas obtenidas se redujo a 2 mm aproximadamente, como se aprecia en la Figura 4.

Las cápsulas separadas de la solución de calcio y lavadas varias veces con agua se guardaron en suspensión acuosa o en una caja de Petri en la refrigeradora a 12 °C. La formación de las cápsulas, el lavado con agua y su posterior almacenamiento en la refrigeradora no influyeron en la viabilidad del hongo, ya que al colocar las cápsulas sobre agar en una caja de Petri, el hongo se desplazó fuera de la cápsula y empezó a crecer alrededor de las mismas, como se observa en la Figura 5.

Por otro lado, se prepararon cajas de Petri con agar y se procedió a sembrar una cepa de *Fusarium spp*, mantenida en el Laboratorio de Protección Vegetal, y aislada de plantas atacadas; luego se colocaron al azar cápsulas con *T. hamatum*. Se observó una inhibición completa del crecimiento del *Fusarium spp* y una esporulación masiva, de color verde, del *T. hamatum*, como se aprecia en la Figura 6. La caja de Petri mostrando el crecimiento del *Fusarium spp*, usada como control, se muestra en la Figura 7.

Los resultados presentados fueron preliminares, más que todo realizados para probar la factibilidad del concepto. Sin embargo, puede decirse que fueron alentadores. A la escala pequeña que se ensayó, la producción de cápsulas de alginato resultó relativamente fácil de llevar a cabo. A una escala mayor es necesario contar con un dispositivo formador de cápsulas automático, en el cual sea posible ajustar el flujo a través de toberas especiales de la solución altamente viscosa del alginato y la biomasa del microorganismo seleccionado. La biomasa de hongos posiblemente sea la que presente mayores problemas por la alta viscosidad de las soluciones.

En los ensayos realizados, se empleó una solución de alginato al 1.5 % en peso, con el objeto de no aumentar la viscosidad y de generar una cápsula que permitiese, por un lado, una difusión rápida del hongo desde adentro de la cápsula hacia el exterior, y por el otro, una vida de la cápsula relativamente corta, de manera que el hongo se esparciera en el compost y suelo para brindar protección a las plantas. En la mayoría de referencias consultadas la concentración de la solución de alginato ha sido de 2%. En esa instancia la viscosidad es alta y la cápsula se presta a una mejor manipulación. Es posible, sin embargo, en ambos casos endurecer la superficie de la cápsula dejando reposar por más tiempo en la solución de cloruro de calcio y efectuando un secado parcial. La técnica *in vitro* empleada para observar el efecto sobre el crecimiento de *Fusarium spp* de las cápsulas de alginato conteniendo el hongo *Trichoderma hamatum*, permitió corroborar la agresividad del segundo hongo sobre el primero. Como se expresó con anterioridad esta agresividad ha sido documentada en la literatura y se han confirmado varios mecanismos de expresión. Además, la técnica permitió corroborar que el hongo encapsulado era capaz de salir de la cápsula y crecer en el medio circundante.

Ejemplo 2: PMCP como sustituto del bromuro de metilo

El bromuro de metilo (CH_3Br) es un fumigante que durante los últimos 50 años ha sido usado para el control de plagas y patógenos, tanto en el suelo antes del plantío como en ciertas operaciones de post cosecha, por ejemplo en el almacenamiento de granos (Fields & White, 2002; Martin, 2003). El tratamiento estándar para el control de plagas y patógenos del suelo, incluyendo nemátodos, bacterias, hongos y malezas, en cultivos de alto-precio, como hortalizas (i.e. tomate y arveja china) frutas (i.e. melón y fresas) y flores, es la fumigación antes del plantío con una mezcla de bromuro de metilo y cloropicrín, tricloronitrometano (CCl_3NO_2) o gas lacrimógeno. Este último, agregado no sólo por su propiedad biocida sino también como un agente de precaución y alarma por la alta toxicidad del bromuro de metilo hacia el ser humano (Yang et al, 1995).

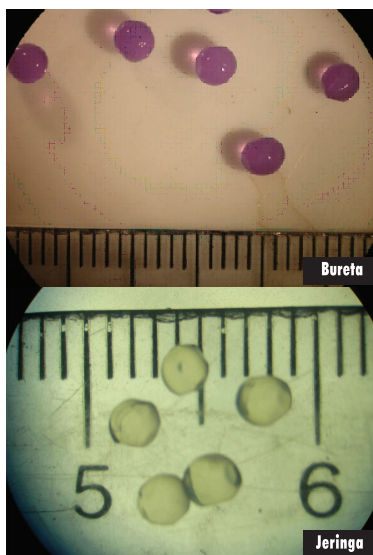


Figura 4.
Tamaño de las cápsulas elaboradas (métrica mostrada en cm)

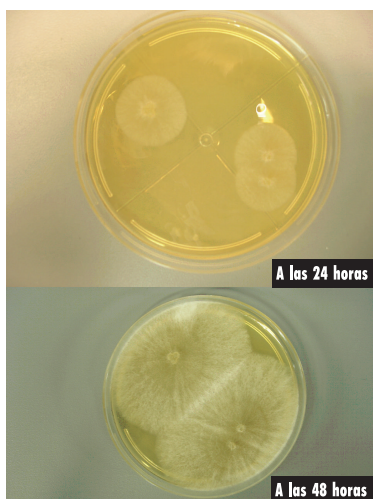


Figura 5.
Viabilidad del hongo en la cápsula.

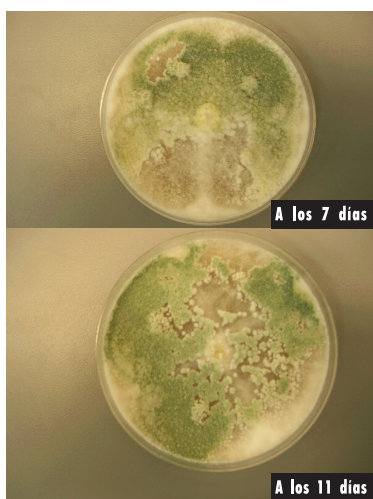


Figura 6.
Destrucción del micelio del hongo *Fusarium* spp por el hongo *Trichoderma hamatum*

Investigaciones de las emisiones del bromuro de metilo reportan que entre 30 a 90% del gas aplicado al suelo se pierde a la atmósfera contribuyendo en forma significativa a la destrucción del ozono estratosférico (Yagi et al, 1993; 1995). La variabilidad encontrada al hacer esta medición se ha explicado atribuyéndola a la profundidad a la cual se inyecta el gas en el suelo, el tipo de recubrimiento plástico que se hace, las características intrínsecas del suelo, como humedad, textura, contenido de materia orgánica y temperatura (Gan et al, 1994). También han tenido efecto variables del ambiente, como la radiación solar, la presión barométrica, la velocidad del viento y la humedad relativa del aire (Wang et al, 1997). Inmediatamente después de la aplicación del bromuro de metilo, al área fumigada se le cubre con polietileno de alta densidad. Aunque esto disminuye las emisiones, no las elimina (Martín, 2003). Para lograrlo es necesario usar copolímeros que contienen poliamidas o etilen vinil alcohol, los cuales son prácticamente impermeables al bromuro de metilo, pero que desafortunadamente son más costosos.

El Protocolo de Montreal, como tratado internacional, ha ordenado una eliminación gradual de la producción y el comercio mundial del bromuro de metilo, que finalizó con una prohibición total en enero del 2005. Sin embargo, desde esa fecha se han permitido casos críticos y excepcionales a solicitud de cada país según convenios en el ámbito internacional. Para países en vías de desarrollo, incluyendo Guatemala, el plazo se ha extendido hasta enero del 2015 (Martín, 2003).

Hay que indicar que la mayor fuente de bromuro de metilo hacia la atmósfera, no es la aplicación en suelos agrícolas, sino es la combustión de cualquier tipo de biomasa (Mano & Andreae, 1994). Pero mediciones recientes de la concentración de este gas en la atmósfera, por ejemplo las del programa AGAGE (*Advanced Global Atmospheric Gases Experiment*), muestran una franca tendencia a disminuir. Lo anterior pone de manifiesto que las disposiciones del Protocolo de Montreal fueron las correctas y que con ellas se ha logrado un control del bromuro en la atmósfera (Simmonds et al, 2004).

El bromuro de metilo que no escapa a la atmósfera se degrada por procesos biológicos y procesos abióticos en el suelo. La degradación se incrementa al aumentar la materia orgánica del suelo, por ejemplo por la adición de compost de estiércol (Gan et al, 1998a). Otras investigaciones han reportado el aislamiento de bacterias facultativas capaces de utilizar el bromuro de metilo como fuente de carbono y energía, por ende se ha sugerido que a los suelos, previa fumigación, se les adicionen inóculos de dichas bacterias (Connell-Hancock et al, 1997).

Ante esta situación, la agroindustria que necesita fumigar el suelo y ciertos productos en almacenamiento y transporte, enfrentan la necesidad de desarrollar estrategias alternas, que tengan la misma, o mejor eficacia, a un costo competitivo. La investigación inmediata se ha enfocado a la evaluación de otros compuestos químicos con actividad biológica, la modificación de las prácticas agrícolas para acomodar su uso y la mejora en las técnicas de aplicación para minimizar los daños ambientales (Schneider et al, 2003). Dentro de los fumigantes alternos aprobados para emplearse, se encuentra la mezcla de cloropicrín con 1,3-dicloropropeno, tanto para ser aplicado con fuste (Telone®, Dow AgroSciences) o utilizando la infraestructura del riego por goteo (InLine®, Dow AgroSciences). Existen varios compuestos que se transforman in situ en metil isotiocianato, otro fumigante alternativo, estos son, el Metam Sodio, sodio N-metilditiocarbamato, en solución (Vapam HL®, AMVAC) y el Dazomet, 3,5-dimetil-(2H)-tetrahydro-1,3,5-tiadiazina-2-tion, una presentación granular. Por otro lado, algunos fumigantes se encuentran en prueba, y en este grupo se incluye al bromuro de propargilo (Fluka Chemical y Albemarle Chemical Co.) y el yoduro de metilo (Midas®, Arvesta). En todos estos casos la estrategia de uso ha sido hacer una mezcla entre ellos para ampliar el espectro de control de plagas y patógenos del suelo y lograr una protección similar a la obtenida con la mezcla de bromuro de metilo y cloropicrín. Sin embargo, las mezclas han dado resultados inesperados, por ejemplo, el Metam Sodio, aceleró la degradación en el suelo del cloropicrín y el 1,3-dicloropropeno, reduciendo la eficacia (Zheng et al, 2004). Estos resultados, y otras características relacionadas con regulaciones y manejo de los fumigantes en sí, inducen cierta incertidumbre en el futuro sostenible de estas mezclas (Duniway, 2002). No es el propósito revisar exhaustivamente la literatura sobre los ensayos en el campo de las mezclas de fumigantes químicos alternos, sin embargo, puede indicarse que la revisión de Martín (2003) y Schneider et al (2003) son adecuadas para satisfacer ese fin.

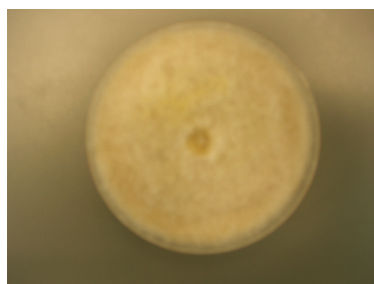


Figura 7.
Crecimiento del hongo *Fusarium* spp mostrando micelio blanco semejando algodón



Figura 8.
Tronco de pino en descomposición natural.



Figura 9.
Producción de compost de cachaza y bagazo de caña de azúcar

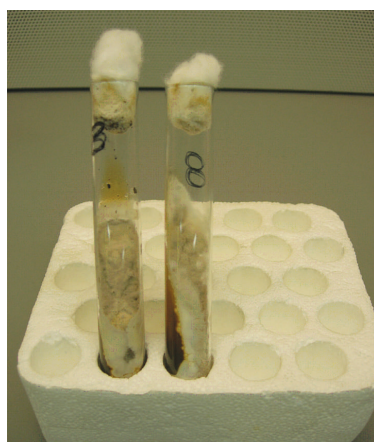


Figura 10.
Crecimiento de los hongos en tubos

Una alternativa de control diferente al uso de agroquímicos, es la biofumigación a través de la incorporación al suelo de residuos de brócoli y que paulatinamente emiten isotiocianatos de una estructura similar al agente activo del fumigante Metam Sodio, y que ha mostrado ser efectivos (Mathiessen et al 2005, 2006).

Resulta interesante hacer la pregunta siguiente ¿porqué no se ha considerado el empleo como fumigante del cloruro de metilo (CH_3Cl) o clorometano, si posee un espectro amplio de acción igual que el bromuro de metilo? Es posible que se haya debido a que es un gas a temperatura y presión del ambiente y por ende, su manejo e incorporación al suelo, haya resultado problemático. El cloruro de metilo es el hidrocarburo halogenado que se encuentra en una mayor proporción en la atmósfera, una mayoría de la cual proviene de fuentes naturales (de los océanos, de hongos, de humedales y aguas salobres) (Harper, 2000; Redeker et al., 2000; Dimmer et al., 2001). Posiblemente la fuente mejor caracterizada sean los hongos involucrados en la podredumbre y degradación de la madera y cualquier otro desperdicio lignocelulósico que ocurre naturalmente, entre los cuales resaltan los hongos basidiomicetos (Field et al., 1995; Watling & Harper, 1998; Moore et al, 2005). La producción más frecuente de clorometano se reportó entre los miembros del género de hongos *Phellinus* (Hymenochaetaeaceae) (Watling & Harper, 1998; Harper et al. 1988). Una de las enzimas que cataliza la formación del gas es la transferasa del cloruro de metilo que forma parte del arsenal bioquímico de todos los hongos que degradan la lignocelulosa, pues la utilizan para metilar la compleja molécula de lignina convirtiéndola en un sustrato de más rápida y eficiente biodegradación; este mecanismo se ha comprobado en hongos basidiomicetos asociados a la degradación de la madera, entre ellos *Phanerochaete chrysosporium* (Jeffers et al, 1997) y *Phellinus pomaceus* (Saxena et al., 1998). Sin embargo el mecanismo de degradar o modificar químicamente la lignina por los hongos de podredumbre parda todavía se desconoce, aunque se tiene evidencia veraz de que ocurre (Yelle et al. 2008). También se ha demostrado recientemente que la producción de los organohalogenados volátiles por hongos basidiomicetos incluye el yoduro de metilo (Ban-nai et al., 2006).

Recientemente se ha informado en la literatura científica de emisiones considerables hacia la atmósfera de cloruro de metilo proveniente directamente de plantas tropicales (Yokouchi et al, 2002). También se ha presentado evidencia que este compuesto se produce empleando el mismo mecanismo químico en diversos ambientes del planeta. El mecanismo implica la conversión abiótica del cloro a cloruro de metilo, en la que el donante del grupo metilo es la pectina, uno de los polímeros distribuido ampliamente en las plantas. Emisiones significativas se cuantificaron provenientes de hojas en senescencia o muertas a temperatura ambiente. Dichas emisiones aumentaron drásticamente con la temperatura (Hamilton et al, 2003).

¿No sería posible, entonces, aprovechar este fenómeno natural en sistemas en donde se estimule su acción y se dirija hacia un objetivo específico, como en este caso, la fumigación de suelos antes del plantío? ¿Será posible generar *in situ* el fumigante de suelos en concentraciones adecuadas para que cumpla la misión?

Ensayos preliminares con hongos de podredumbre parda de la madera

En las pruebas se utilizaron los hongos siguientes: *Phellinus pachyploeus* CBS 446.76; *Phellinus overholtsii* CBS 196.55; *Phellinus pini* CBS 210.36; *Phellinus lundelli* CBS 540.72, *Isaria fumosorosea* CBS 240.93; *Phanerochaete chrysosporium* CBS671.71, obtenidos del Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS), Utrecht, Países Bajos. Además los hongos: *Phellinus ignarius* DSMZ 4598; *Phellinus ignarius* DSMZ 4818; *Fomitopsis pinicola* DSMZ 3521; *I. hispidus* DSMZ 8658; *Phellinus pini* DSMZ 5238; *Inonotus andersoni* CBS 312.39, obtenidos del Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Alemania. Todos los hongos son basidiomicetos de podredumbre parda de la madera, con excepción de *P. chrysosporium* que es un basidiomiceto de podredumbre blanca y el cual se empleó como un control negativo, ya que se conoce que el clorometano que produce lo emplea como donador de grupos metilo en la biosíntesis de alcohol veratrílico, importante metabolito involucrado en la degradación de la lignina (Harper et al., 1990)

Se utilizaron dos fuentes de lignocelulosa en los ensayos: madera molida y compost. La madera se obtuvo de un tronco de pino en descomposición, ver Figura 8, y se redujo su tamaño en un molino de cuchillas

e impacto de planta piloto. El compost se produjo de cachaza y bagazo (70-30% en peso seco) en una instalación piloto localizada en Proesur-UVG, Santa Lucía Cotzumalguapa como se muestra en la Figura 9.

La madera molida se incorporó en un 5 % a un agar de extracto de malta y se prepararon tubos tapados con algodón. Los tubos se inocularon con los hongos en prueba y se mantuvieron en una incubadora a 32 °C por espacio de 34 días, ver Figura 10. El compost molido se incorporó en un 3 % al agar con extracto de malta y de nuevo se prepararon tubos tapados con algodón dejándose en la incubadora a 32 °C por un espacio de 22 días. Los tapones de algodón se cambiaron por tapones de hule con el objeto de acumular las emanaciones gaseosas producidas por los hongos y tres días después se obtuvo una muestra de la fase gaseosa de cada tubo y se inyectó a un cromatógrafo de gases para cuantificar la producción de compuestos volátiles organohalogenados. Se usó un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 5890 Series II, con las características siguientes: columna HP-5 capilar de 30 metros de largo; gas de arrastre, nitrógeno a un flujo de 1 mL por minuto, temperatura de puerto de inyección, 200 °C; temperatura detector, 235 °C; temperatura del horno, 35 °C; rampa, tres minutos de equilibrio, incremento de 5 grados por minuto hasta 50 °C con un tiempo final de 3 minutos. Se emplearon mezclas estándar de cloruro y bromuro de metilo en nitrógeno de 1 ppm (Airgas Specialty Gases, Port Allen, LA).

Los resultados obtenidos se listan en los Cuadros 1 y 2 para los hongos ensayados en madera de pino y en compost respectivamente. La indicación ND en algunas filas de los cuadros significa que no se detectó producción que pudiera medirse bajo las condiciones de análisis. En el Cuadro 1 cuatro hongos se prepararon en duplicado con el objeto de estimar la variación en la producción. En el medio con compost se incluyó un hongo adicional *I. andersonii* CBS 312.39.

Cuadro 1.

Producción de compuestos volátiles organohalogenados en un medio sólido de agar-madera de pino en tres días después de 34 días de crecimiento.

Hongo	Cloruro de metilo ppm	Bromuro de metilo ppm
<i>P. pini</i> CBS 210.36	34.46	0.79
<i>P. pini</i> CBS 210.36	43.34	0.90
<i>F. pinicola</i> DSMZ 3521	ND.	ND.
<i>F. pinicola</i> DSMZ 3521	ND.	ND.
<i>P. lundellii</i> CBS 540.72	27.46	1.39
<i>P. pachyploeus</i> CBS 446.76	49.54	0.56
<i>P. ignarius</i> DSMZ 4958	ND.	ND.
<i>P. overholtsii</i> CBS 196.55	37.46	0.96
<i>P. overholtsii</i> CBS 196.55	54.17	1.15
<i>I. hispidus</i> DSMZ 8658	59.66	0.00
<i>I. hispidus</i> DSMZ 8658	43.49	0.40
<i>P. chrysosporium</i> CBS 671.61	ND.	ND.

Cuadro 2.

Producción de compuestos volátiles organohalogenados en un medio sólido de agar-compost en tres días después de 22 días de crecimiento.

Hongo	Cloruro de metilo ppm	Bromuro de metilo ppm
<i>P. pini</i> CBS 210.36	43.29	0.65
<i>F. pinicola</i> DSMZ 3521	ND	ND
<i>P. lundellii</i> CBS 540.72	78.38	0.10
<i>P. pachyploeus</i> CBS 446.76	3.72	0.99
<i>P. ignarius</i> DSMZ 4818	ND	ND
<i>P. overholtsii</i> CBS 196.55	6.60	5.09
<i>I. hispidus</i> DSMZ 8658	79.68	0.15
<i>I. andersonii</i> CBS 312.39	ND	2.51
<i>P. chrysosporium</i> CBS 671.71	ND	ND

Los datos se analizaron empleando un análisis de variancia (Andeva) bajo dos perspectivas. Primero, se emplearon los datos del Cuadro 1 para aquellos tres hongos (*P. pini*, *P. overholtsii* e *I. hispidus*) en donde la producción se cuantificó en tubos duplicados (Andeva de una vía). Se encontró que no hubo diferencias en la producción de cloruro de metilo por los tres hongos ($P = 0.5336$), es decir, los tres hongos escogidos produjeron la misma cantidad del gas en ese sustrato y tiempo establecido. Por el contrario, en la producción de bromuro de metilo, los valores promedio fueron estadísticamente diferentes entre sí ($P = 0.0381$), siendo la diferencia entre *P. overholtsii* e *I. hispidus* la dominante (P de Bonferroni ajustada = 0.056). Los resultados del ensayo y la interpretación del análisis pueden apreciarse en la Gráfica 1.

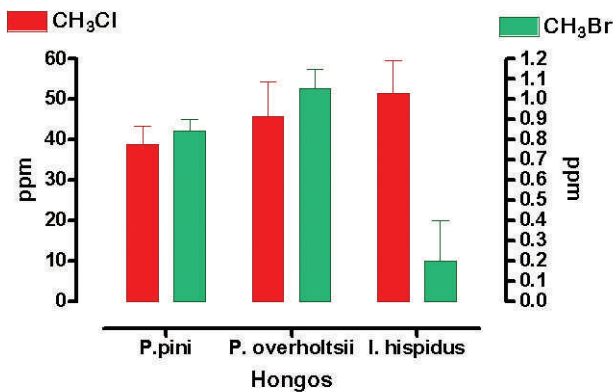
En la segunda perspectiva se emplearon los datos de los cinco hongos productores de compuestos gaseosos organohalogenados (*P. pini*, *P. overholtsii*, *I. hispidus*, *P. lundellii*, y *P. pachyploeus*) usados con los dos diferentes sustratos lignocelulósicos (madera de pino y compost de cachaza y bagazo de caña) (Andeva de dos vías) con el objeto de estimar si existía también un efecto del sustrato sobre la producción. Se encontró que la producción de cloruro de metilo fue influida en forma prácticamente significativa ($P = 0.0719$) por el hongo y significativa por la interacción entre el hongo y el sustrato ($P = 0.0475$), es decir, la diferencia en producción entre los dos sustratos depende del hongo a que se refiera. En lo que respecta a la producción de bromuro de metilo se encontró que el hongo ($P = 0.0016$), el sustrato ($P = 0.0119$) y la interacción entre hongo y sustrato ($P = 0.0023$), eran significativas. Es decir la producción varía respecto al sustrato y al hongo empleado.

El paso siguiente fue el de intentar obtener en el laboratorio un crecimiento de biomasa abundante y consistente de los diferentes hongos. Se emplearon dos estrategias. El cultivo en fase líquida y el crecimiento de superficie en fase sólida.

El crecimiento en fase líquida se llevó a cabo en frascos agitados a 100 rpm y 25 °C en un medio estéril conteniendo 30 g/L de glucosa, 1 g/L K_2HPO_4 , 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ y cuatro fuentes diferentes de nitrógeno, a) sulfato de amonio (21 % N_2) 8 g/L, b) bacto-peptona (15.9 % N_2) 10.56 g/L, c) Extracto de Levadura (11 % N_2) 15.27 g/L. El pH inicial del medio fue: a) con sulfato de amonio 7.50, b) con bacto-peptona 7.95, c) con extracto de levadura 7.95. A las 168 horas se filtraron los contenidos de los frascos y se estimó

Gráfica 1.

Producción de cloruro y bromuro de metilo en un medio de agar y madera de pino molida.



la cantidad de biomasa producida, en gramos secos por litro, y en el líquido el pH final. El crecimiento de los cinco hongos ensayados fue lento y en aglomerados esféricos grandes como se aprecia en el Cuadro 3 el cual muestra los resultados para tres de los cinco hongos. El término MP en una fila del cuadro indica que se alteró la muestra en el manejo de la misma.

Aunque existe una variación apreciable en los resultados de la biomasa producida, pareciera que los dos *Inonotus* favorecieron el extracto de levadura como fuente de nitrógeno. El *P. pini* empleó mejor el nitrógeno inorgánico. El pH final fue en su mayoría ácido, notoriamente cuando se empleó sulfato de amonio. El crecimiento en forma de agregados, de

diferente tamaño según la especie, ha sido reportado previamente por Hwang et al (2004) para tres especies de *Phellinus* (*P. baumii*, *P. gilvus* y *P. linteus*). Hwang et al (2003) encontraron que la biomasa producida en cultivo líquido durante 196 horas dependía de la fuente de carbono, siendo los mejores substratos la maltosa y el sorbitol. Los datos de peso seco estuvieron entre 1.22 a 3.83 gramos por litro, parecidos a los del cuadro anterior. Encontraron también que los sólidos del procesamiento de maíz y el extracto de malta eran las mejores fuentes de nitrógeno. El pH final, sin embargo, fue más bajo que el encontrado en este trabajo, ya que varió entre 3.21 y 3.96 dependiendo de la fuente de carbono. Se conoce que los hongos de podredumbre parda producen durante el crecimiento ácido oxálico (Munir et al., 2001; Schilling & Jellison, 2006), lo que podría explicar el pH ácido final en el medio.

El crecimiento en aglomerados esféricos grandes mostrado en fase líquida no es atractivo para un aumento de escala de la producción, principalmente por los problemas de estabilidad de la biomasa que pueden encontrarse en los reactores agitados. Por lo tanto se procedió con los ensayos de crecimiento en superficie en fase sólida.

El crecimiento de superficie en fase sólida se inició con ensayos en cajas de Petri con agar con extracto de malta al cual se le incorporó 3 % de compost producido de cachaza y bagazo (70-30% en peso seco). Se inocularon los hongos dejándose las cajas en la incubadora a 30 °C. El crecimiento radial se observó a diferentes tiempos. El orden relativo del crecimiento fue el siguiente, de más rápido a más lento: *Phellinus pini* CBS 210.36, *Inonotus andersoni* CBS 312.39, *Inonotus hispidus* DSMZ 8658, *Phellinus lundelli* CBS 540.72 y *Phellinus overholtsii* CBS 196.55. La Figura 11 ilustra lo observado para el hongo que más rápido creció.

Cuadro 3.

Producción de biomasa, pH final del medio líquido y observación microscópica del micelio después de 168 horas de crecimiento

Fuente de N2	Biomasa g/L <i>Phellinus pini</i> (pH final)	Biomasa g/L <i>Inonotus hispidus</i> (pH final)	Biomasa g/L <i>Inonotus andersonii</i> (pH final)
Con sulfato	3.59 (4.15)	2.30 (4.70)	0.82 (6.80)
Con bacto-peptona	MP (5.20)	1.86 (7.00)	0.76 (7.00)
Con extracto de levadura	2.30 (6.00)	3.84 (6.50)	2.54 (6.30)

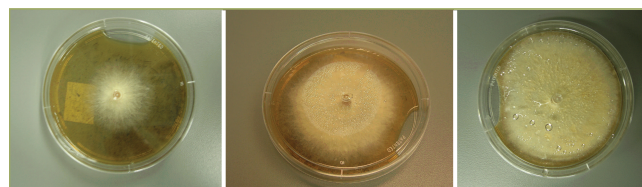
Estas pruebas permitieron seleccionar para futuros ensayos a los hongos *Phellinus pini* CBS 210.36, *Inonotus andersoni* CBS 312.39, e *Inonotus hispidus* DSMZ 8658 por mostrar un crecimiento más rápido y producir al mismo tiempo los compuestos gaseosos organohalogenados.

A continuación se procedió a ensayar el crecimiento en sustratos sólidos que se encontraran fácilmente en la práctica. En la literatura reciente (Lee et al., 2008) se ha informado del crecimiento de *Phellinus linteus* en subproductos del procesamiento de maíz. Se decidió, entonces, escoger el sorgo (maicillo). Se tomó parte del micelio crecido en agar y se depositó en la superficie de frascos de vidrio de boca ancha, conteniendo 80 gramos de sorgo esterilizado por 25 min a 121 °C. La Figura 12 muestra el crecimiento abundante obtenido con *Phellinus pini* CBS 210.36 después de 312 horas de incubación a 30 °C.

Están en progreso experimentos en donde el crecimiento del hongo se lleva a cabo en fracciones de compost proveniente de caña de desecho y cachaza, empleando como inóculo micelio anclado en sorgo como antes se indicó. Se piensa finalizar midiendo, no solo la producción de organohalogenados, sino también la actividad de la mezcla hongo-compost hacia microorganismos patógenos de plantas del suelo, a nivel de laboratorio e invernadero.

AGRADECIMIENTO

Parte de las investigaciones realizadas se llevaron a cabo con financiamiento de los proyectos FODECYT 001-2006 y AGROCYT 005-2005 otorgados a la Universidad del Valle de Guatemala por la Secretaría Nacional de Ciencia y Tecnología, SENACYT. Se reconoce la asistencia técnica en la realización de los experimentos del señor Carlos Arias del Laboratorio de Ingeniería Bioquímica del Instituto de Investigaciones de la Universidad del Valle de Guatemala.



► **Figura 11.**
Crecimiento de *Phellinus pini*
a las 96, 168 y 246 horas.



► **Figura 12.**
Crecimiento de *Phellinus pini* en sorgo
al inicio y después de 313 horas.

BIBLIOGRAFÍA

- Aryantha, I. P., R. Cross, et al. (2000) Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures **Phytopathol.** **90** : 775-782
- Ban-nai, T., Y. Muramatsu, et al. (2006) Rate of iodine volatilization and accumulation by filamentous fungi through laboratory cultures **Chemosphere** **65**: 2216-2222
- Borneman, J. and J. O. Becker (2007) Identifying Microorganisms Involved in Specific Pathogen Suppression in Soil **Annu. Rev. Phytopathol.** **45**: 153-72
- Borrero, C., M. I. Trillas, et al. (2004) Predictive Factors for the Suppression of Fusarium Wilt of Tomato in Plant Growth Media **Phytopathol.** **94**: 1094-1101
- Brar, S. K., M. Verma, et al. (2006) Recent advances in downstream processing and formulations of *Bacillus thuringiensis* based biopesticides **Process Biochem.** **41**: 323-342
- Ceuster, T. J. J. D. and H. A. J. Hoitink (1999) Prospects for composts and biocontrol agents as substitutes for methyl bromide in biological control of plant diseases **Compost Science & Utilization** **7** (3): 6-15

- Compant, S., B. Duffy, et al. (2005) Use of Plant Growth-Promoting Bacteria for Biocontrol of Plant Diseases: Principles, Mechanisms of Action, and Future Prospects **Appl. Environ. Microbiol.** **71**: 4951-4959
- Connell-Hancock, T. L., A. M. Costello, et al. (1998) Strain IMB-1, a novel bacterium for the removal of methyl bromide in fumigated agricultural soils **Appl. Environ. Microbiol.** **64**: 2899-2905
- Crickmore, N. (2006). Review: Beyond the spore – past and future developments of *Bacillus thuringiensis* as a biopesticide **J. of Appl. Microbiol.** **101**: 616-619
- Chae, D. H., R. D. Jin, et al. (2006) Control of late blight (*Phytophthora capsici*) in pepper plant with a compost containing multitude of chitinase-producing bacteria **BioControl** **51**: 339-351
- Chandler, D., G. Davidson, et al. (2008) Microbial biopesticides for integrated crop management: an assessment of environmental and regulatory sustainability **Trends Food Sci. & Technol.** **19** (5): 275-283
- Dimmer, C. H., P. G. Simmonds, et al. (2001) Biogenic fluxes of halomethanes from Irish peatland ecosystems **Atmospheric Environ.** **35**: 321-330
- Douglas, A. E. (2007) Symbiotic microorganisms: untapped resources for insect pest control **Trends Biotechnol.** **26** (8): 338-342

- Duniway, J. M. (2002) Status of Chemical Alternatives to Methyl Bromide for Pre-Plant Fumigation of Soil **Phytopathol.** **92**: 1337-1343
- El-Bendary, M. A. (2006) Review *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* biopesticides production **J. Basic Microbiol.** **2**: 158-170
- El-Ghaouth, A. (1997) Biologically-based alternatives to synthetic fungicides for the control of postharvest diseases **J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.** **19**: 160-162
- Emmert, E. A. B. and J. Handelsman (1999) Biocontrol of plant disease: a (Gram-) positive perspective **FEMS Microbiol. Letters** **171**: 1-9
- Fichtner, E. J., D. M. Benson, et al. (2004) Abiotic and Biological Suppression of *Phytophthora parasitica* in a Horticultural Medium Containing Composted Swine Waste **Phytopathol.** **94**: 780-788
- Field, J. A., F. J. M. Verhagen, et al. (1995) Natural organohalogen production by basidiomycetes **Trends Biotechnol.** **13** (11): 451-456
- Fields, P. G. and N. D. White (2002) Alternatives to methyl bromide treatments for stored-product and quarantine insects **Annu Rev Entomol** **47**: 331-359
- Fravel, D. R., J. J. Marois, et al. (1985) Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix **Phytopathol.** **75**: 774-777
- Froyd, J. (1997) Can synthetic pesticides be replaced with biologically-based alternatives?—an industry perspective **J. Ind. Microbiol. & Biotechnol.** **19**: 192-195
- Gan-Mor, S. and G. A. Matthews (2003) Recent Developments in Sprayers for Application of Biopesticides—an Overview **Biosystems Eng.** **84**: 119-125
- Gan, J., S. R. Yates, et al. (1994) Effect of soil properties on degradation and sorption of methyl bromide in soil **Chemosphere** **29**: 2685-2700
- Gan, J., S. R. Yates, et al. (1998) Application of Organic Amendments To Reduce Volatile Pesticide Emissions from Soil **Environ. Sci. Technol.** **32**: 3094-3098
- Hamilton, J. T. G., W. C. Roberts, et al. (2003) Chloride methylation by plant pectin: an efficient environmentally significant process **Science** **301**: 206-209
- Harman, G. E. (2000) Myths and dogmas of biocontrol Changes in Perceptions Derived from Research on *Trichoderma harzianum* T-22 **Plant Disease** **84**: 377-393
- Harman, G. E., C. R. Howell, et al. (2004) *Trichoderma* species —opportunistic, avirulent symbionts **Nature Reviews Microbiol.** **2**: 43-56
- Harper, D. B., J.A. Buswell, J.T. Kennedy & J.T.G. Hamilton (1990) Chloromethane, methyl donor in veratryl alcohol biosynthesis in *Phanerochaete chrysosporium* and other lignin degrading fungi **Appl. Environ. Microbiol.** **56**: 3450-3457
- Harper, D. B. (2000) The global chloromethane cycle: biosynthesis, biodegradation and metabolic route **Nat. Prod. Rep.** **17**: 337-348
- Heraux, F. M. G., S. G. Hallet, et al. (2005) Composted chicken manure as a medium for the production and delivery of *Trichoderma virens* for weed control **HortScience** **40**: 1394-1397
- Héraux, F. M. G., S. G. Hallett, et al. (2005) Combining *Trichoderma virens*-inoculated compost and a rye cover crop for weed control in transplanted vegetables **Biol. Control** **34**: 21-26
- Hoitink, H. A. J., M. S. Krause, et al. (2001) Spectrum and mechanisms of plant disease control with composts in: P. J. Stoffella and B. A. Kahn (eds) **Compost utilization in horticultural cropping systems**. Lewis Publishers: 263-273
- Howell, C. R. (2003) Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts **Plant Disease** **87**: 4-10
- Hutchinson, C. M. (1999) *Trichoderma virens*-Inoculated Composted Chicken Manure for Biological Weed Control **Biol. Control** **16**: 217-222
- Hwang, H.-J., S.-W. Kim, et al. (2003) Production and characterization of exopolysaccharides from submerged culture of *Phellinus linteus* KCTC 6190 **Enzyme Microb. Technol.** **33**: 309-319
- Hwang, H. J., S. W. Kim, et al. (2004) Morphological and rheological properties of the three different species of basidiomycetes *Phellinus* in submerged cultures **J. of Appl. Microbiol.** **96**: 1296-1305
- Hynes, R. K. and S. M. Boyetchko (2006) Research initiatives in the art and science of biopesticide formulations **Soil Biol. Biochem.** **38**: 845-849
- Jeffers, M. R., W. C. McRoberts, et al. (1997) Identification of a phenolic 3-O-methyltransferase in the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium* **Microbiol.** **142**: 1975-1981
- Kannangara, T., R. S. Uthkade, et al. (2004) Compost effect on greenhouse cucumbers and suppression of plant pathogen *F. oxysporum* **Compost Science & Utilization** **12** (4): 308-313
- Knudsen, G. R. and L. Bin (1990) Effects of temperature, soil moisture, and wheat bran on growth of *Trichoderma harzianum* from alginate pellets **Phytopathol.** **80**: 724-727
- Lacey, L. A., R. Frutos, et al. (2001) Insect Pathogens as Biological Control Agents: Do They Have a Future? **Biol. Control** **21**: 230-248
- Lewis, J. A. and G. C. Papavizas (1985) Characteristics of alginate pellets formulated with *Trichoderma* and *Gliocladium* and their effect on the proliferation of the fungi in soil **Plant Pathol.** **34**: 571-577
- Mano, S. and M. O. Andreae (1994) Emission of Methyl Bromide from Biomass Burning **Science** **263** (5151): 1255-1257
- Martin, F. N. (2003) Development of alternative strategies for management of soil-borne pathogens currently controlled with methyl bromide **Annu. Rev. Phytopathol.** **41**: 325-350
- Mathre, D. E., R. J. Cook, et al. (1999) From Discovery to Use Traversing the World of Commercializing Biocontrol Agents for Plant Disease Control **Plant Disease** **83**: 972-983
- Matthiessen, J. N. and J. A. Kirkegaard (2006) Biofumigation and Enhanced Biodegradation: Opportunity and Challenge in Soilborne Pest and Disease Management **Crit. Rev. Plant Sciences** **25**: 235-265
- Matthiessen, J. N. and M. A. Shackleton (2005) Biofumigation: environmental impacts on the biological activity of diverse pure and plant-derived isothiocyanates **Pest Manag. Sci.** **61**: 1043-1051
- Mazzola, M. (2004) Assessment and management of soil microbial community structure for disease suppression **Annu. Rev. Phytopathol.** **42**: 35-59
- Millner, P. D., C. R. Ringer, et al. (2004) Suppression of strawberry root disease with animal manure composts **Compost Science & Utilization** **12**(4): 298-307
- Montesinos, E. (2003) Development, registration and commercialization of microbial pesticides for plant protection **Int Microbiol** **6**: 245-252

- Moore, R. M., A. Gut, et al. (2005) A pilot study of methyl chloride emissions from tropical woodrot fungi **Chemosphere** **58**: 221-225
- Morales, H. (2002) Pest management in traditional tropical agroecosystems: Lessons for pest prevention research and extension **Integrated Pest Manag. Rev.** **7**: 145-163
- Munir, E., J. J. Yoon, et al. (2001) A physiological role for oxalic acid biosynthesis in the wood-rotting basidiomycete *Fomitopsis palustris* **Proc.National Acad. Sciences** **98** (20): 11126-11130
- Navon, A. (2000) *Bacillus thuringiensis* insecticides in crop protection reality and prospects **Crop Protection** **19** (669-676)
- Noble, R. and E. Coventry (2005) Suppression of soil-borne plant diseases with composts: A review **Biocontrol Sci. Technol.** **15**(1): 3-20
- Oremland, R. S., L. G. Miller, et al. (1994) Degradation of methyl bromide in anaerobic sediments **Environ. Sci. Technol.** **28**: 514-520
- Ozer, N. and N. D. Koycu (2006) The ability of plant compost leachates to control black mold (*Aspergillus niger*) and to induce the accumulation of antifungal compounds in onion following seed treatment **BioControl** **51**: 229-243
- Papavizas, G. C., D. R. Fravel, et al. (1988) Proliferation of *Talaromyces flavus* in soil and survival in alginate pellets **Phytopathol.** **77**: 131-136
- Punja, Z. K. and R. S. Utthede (2003) Using fungi and yeasts to manage vegetable crop diseases **Trends Biotechnol.** **21** (9): 400-407
- Raviv, M., Y. Oka, et al. (2005) High-nitrogen compost as a medium for organic container-grown crops **Bioresource Technol.** **96**: 419-427
- Redeker, K. R., N.-Y. Wang, et al. (2000) Emissions of methyl halides and methane from rice paddies **Science** **290**: 966-969
- Russo, A., M. Basaglia, et al. (2004) *P. fluorescens* 134 as a biological control agent (BCA) model in cell immobilization **Biotechnol Prog.** **21**: 309-314
- Santos, M., F. Dıanez, et al. (2008) Grape marc compost: microbial studies and suppression of soil-borne mycosis in vegetable seedlings **World J Microbiol Biotechnol** **24**: 1493-1505
- Saxena, D., A. Aquad, et al. (1998) Biochemical characterization of chloromethane emission from the wood-rotting fungus *Phellinus pomaceus* **Appl.Environ. Microbiol.** **64**: 2831-2835
- Scheuerell, S. J. and W. F. Mahaffee (2005) Microbial Recolonization of Compost After Peak Heating Needed for the Rapid Development of Damping-Off Suppression **Compost Science & Utilization** **13** (1): 65-71
- Scheuerell, S. J., D. M. Sullivan, et al. (2005) Suppression of Seedling Damping-Off Caused by *Pythium ultimum*, *P. irregulare*, and *Rhizoctonia solani* in Container Media Amended with a Diverse Range of Pacific Northwest Compost Sources : 306-315
- Schilling, J. S. and J. Jellison (2006) Metal Accumulation without Enhanced Oxalate Secretion in Wood Degraded by Brown Rot Fungi **Appl.Environ. Microbiol.** **72**: 5662-5665
- Schisler, D. and P. Slininger (1997) Microbial selection strategies that enhance the likelihood of developing commercial biological control products J. Ind. Microbiol. & Biotechnol. **19**: 172-179
- Schisler, D. A., P. J. Slininger, et al. (2004) Formulation of *Bacillus* spp. for Biological Control of Plant Diseases **Phytopathol.** **94**: 1267-1271
- Schneider, S. M., E. N. Rosskopf, et al. (2003) United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service research on alternatives to methyl bromide: pre-plant and post-harvest **Pest Manag. Sci.** **59**: 814-826
- Simmonds, P. G., R. G. Derwent, et al. (2004) AGAGE observations of methyl bromide and methyl chloride at Mace Head, Ireland, and Cape Grim, Tasmania, 1998-2001 **J. Atmospheric Chem.** **47**: 243-269
- Stiling, P. and T. Cornelissen (2005) What makes a successful biocontrol agent? A meta-analysis of biological control agent performance **Biol. Control** **34**: 236-246
- Strange, R. N. and P. R. Scott (2005) Plant Disease: A Threat to Global Food Security **Annu. Rev. Phytopathol.** **43**: 83-116
- Stukenbrock, E. H. and B. A. McDonald (2008) The Origins of Plant Pathogens in Agro-Ecosystems **Annu. Rev. Phytopathol.** **46**: 75-100
- Suarez-Estrella, F., C. Vargas-Garcıa, et al. (2007) Antagonistic activity of bacteria and fungi from horticultural compost against *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis* **Crop Protection** **26**(46-53)
- Trillas, M. I. (2002) Using compost as a methyl bromide alternative **Biocycle** **43** (9): 64-68
- Vallet-Gely, I., B. Lemaitre, et al. (2008) Bacterial strategies to overcome insect defences **Nature Rev. Microbiol.** **6**: 302-313
- van Lenteren, J. C. (2000) A greenhouse without pesticides: fact or fantasy? **Crop Protection** **19**: 375-384
- Verma, M., S. K. Brar, et al. (2007) Review. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: Panoply of biological control **Biochem. Eng. J.** **37**: 1-20
- Wang, D., S. R. Yates, et al. (1997) Reducing methyl bromide emission with a high barrier plastic film and reduced dosage **Environ. Sci. Technol.** **31**: 3686-3691
- Wattling, R. and D. B. Harper (1998) Chloromethane production by wood-rotting fungi and an estimate of the global flux to the atmosphere **Mycol. Res.** **102**: 769-787
- Weidemann, G. J. (1988) Effects of Nutritional Amendments on Conidial Production of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* on Sodium Alginate Granules and on Control of Texas Gourd **Plant Disease** **72**: 757-759
- Whetstone, P. A. and B. D. Hammock (2007) Review Delivery methods for peptide and protein toxins in insect control **Toxicon** **49**: 576-596
- Winder, R. S., J. J. Wheeler, et al. (2003) Microencapsulation: a Strategy for Formulation of Inoculum **Biocontrol Sci. Technol.** **13**: 155-169
- Yagi, K., J. Williams, et al. (1993) Agricultural soil fumigation as a source of atmospheric methyl bromide **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **90**: 8420-8423
- Yagi, K., J. Williams, et al. (1995) Atmospheric Methyl Bromide (CH₃Br) from Agricultural Soil Fumigations **Science** **267**: 1979-1981
- Yang, R. S. H., K. L. Witt, et al. (1995) Toxicology of methyl bromide **Rev. Environ.Cont. Toxicol.** **142**: 65-85
- Yelle, D. J., J. Ralph, et al. (2008) Evidence for cleavage of lignin by a brown rot basidiomycete **Environ. Microbiol.** **10**: 1844-1849
- Yokouchi, Y., M. Ikeda, et al. (2002) Strong emission of methyl chloride from tropical plants **Nature** **416** (6877): 163-165
- Zheng, W., S. R. Yates, et al. (2004) Transformation of chloropicrin and 1,3-dichloropropene by metam sodium in a combined application of fumigants **J. Agric. Food Chem.** **52**: 3002-3009
- Zimmermann, G. (2007) Review on safety of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Beauveria brongniartii* **Biocontrol Sci. Technol.** **17**: 553-596

BIBLIOGRAFÍA DE VIÑETA

Benítez, T., Rey, M., Delgado-Jarana, J., Rincón, A.M. & Limón, M.C. (2000) Improvement of *Trichoderma* strains for biocontrol **Rev. Iberoam. Micol.** **17** (1): S31-6

Bloemberg, G.V. & Lugtenberg, B.J. (2001) Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria **Curr. Opin. Plant Biol.** **4**: 343-50

Casique-Arroyo, G., Bideshi, D., Salcedo-Hernández, R. & Barboza-Corona, J.E. (2007) Development of a recombinant strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-73 that produces the endochitinase ChiA74 **Antonie van Leeuwenhoek** **92**: 1-9

Cao, Y., Peng, G., He, Z., Wang, Z., Yin, Y. & Xia, Y. (2007) Transformation of *Metarhizium anisopliae* with benomyl resistance and green fluorescent protein genes provides a tag for genetically engineered strains **Biotechnol Lett.** **229**: 907-11

Cardoza, R.E., Vizcaino, J.A., Hermosa, M.R., Monte, E. & Gutiérrez, S. (2006) A comparison of the phenotypic and genetic stability of recombinant *Trichoderma* spp. generated by protoplast- and *Agrobacterium*-mediated transformation **J. Microbiol.** **44**: 383-95

Cheng, Y., McNally, D.J., Labbé, C., Voyer, N., Belzile, F. & Bélanger, R.R. (2003) Insertional mutagenesis of a fungal biocontrol agent led to discovery of a rare cellobiose lipid with antifungal activity **Appl. Environ. Microbiol.** **69**: 2595-602

Chung, S.M., Vaidya, M. & Tzfira, T. (2006) *Agrobacterium* is not alone: gene transfer to plants by viruses and other bacteria **Trends Plant Sci.** **11**: 1-4

Downing, K.J., Leslie, G. & Thomson, J.A. (2000) Biocontrol of the sugarcane borer *Eldana saccharina* by expression of the *Bacillus thuringiensis* cry1Ac7 and *Serratia marcescens* chiA genes in sugarcane-associated bacteria **Appl. Environ. Microbiol.** **66**: 2804-10

Fang, W., Zhang, Y., Yang, X., Zheng, X., Duan, H., Li, Y. & Pei, Y. (2004) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Beauveria bassiana* using an herbicide resistance gene as a selection marker **J Invertebr Pathol.** **85**: 18-24

Fang, W., Pei, Y. & Bidochka, M.J. (2006) Transformation of *Metarhizium anisopliae* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* **Can. J. Microbiol.** **52**: 623-6

Haas, D. & Défago, G. (2005) Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent *pseudomonads* **Nat. Rev. Microbiol.** **3**: 307-19

Jiang, Q., Ying, S.H. & Feng, M.G. (2007) Enhanced frequency of *Beauveria bassiana* blastospore transformation by restriction enzyme-mediated integration and electroporation **J. Microbiol. Methods.** **69**: 512-7

Kramer, K.J. & Muthukrishnan, S. (1997) Insect chitinases: molecular biology and potential use as biopesticides **Insect. Biochem. Mol. Biol.** **27**: 887-900

Liu, X., Peng, D., Luo, Y., Ruan, L., Yu, Z. & Sun, M. (2009) Construction of an *Escherichia coli* to *Bacillus thuringiensis* shuttle vector for large DNA fragments **Appl. Microbiol. Biotechnol.** **82**: 765-72

Liu, T., Wang, T., Li, X. & Liu, X. (2008) Improved heterologous gene expression in *Trichoderma reesei* by cellobiohydrolase I gene (*cbh1*) promoter optimization **Acta Biochim. Biophys. Sin** **40**: 158-65

Praitis, V. (2006) Creation of transgenic lines using microparticle bombardment methods **Methods Mol. Biol.** **351**: 93-107

Screen, S.E., Hu, G. & St Leger, R.J. (2001) Transformants of *Metarhizium anisopliae* sf. *anisopliae* overexpressing chitinase from *Metarhizium anisopliae* sf. *acidum* show early induction of native chitinase but are not altered in pathogenicity to *Manduca sexta* **J. Invertebr. Pathol.** **78**: 260-6

Tzfira, T. & Citovsky, V. (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology **Curr. Opin. Biotechnol.** **17**: 147-54

Weaver, M.A. & Kenerley, C.M. (2008) Competitiveness of a genetically engineered strain of *Trichoderma virens* **Mycopathol.** **166**: 51-9

Yehuda, H., Droby, S., Wisniewski, M. & Goldway, M. (2001) A transformation system for the biocontrol yeast, *Candida oleophila*, based on hygromycin B resistance **Curr. Genet.** **40**: 282-7



Carlos E. Rolz Asturias^a, María del Carmen Samayoa^c & Luis Roberto de León^b

^aCentro de Investigaciones en Ingeniería, Laboratorio de Ingeniería Bioquímica, Instituto de Investigaciones carlosrolz@uvg.edu.gt

^bInvestigador, Laboratorio de Ingeniería Bioquímica y Profesor del Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, Universidad del Valle de Guatemala

^cInvestigador Consultor, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Universidad de San Carlos