

Desarrollo de bioplaguicidas para el control de *F. oxysporum*

Andrés Díaz

Investigador Laboratorio de Control Biológico
Centro de Biotecnología y Bioindustria – CBB
Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – Corpoica.
E-mail: adiaz@corpoica.org.co

Para el desarrollo de un bioproducto se debe cumplir con una serie de etapas que requieren de un trabajo multidisciplinario a mediano y largo plazo, con una inversión que fácilmente puede superar los 5 millones de dólares en 5 años (Figura 11).

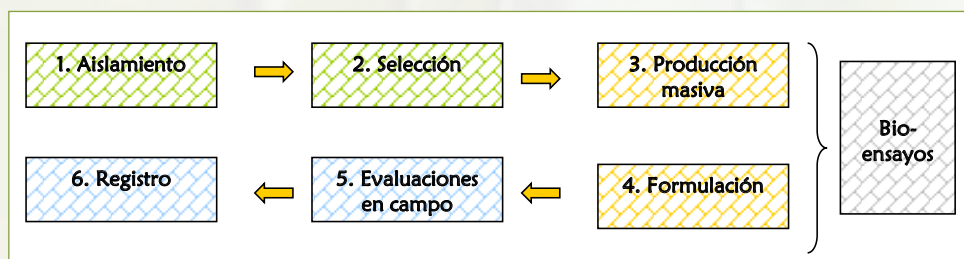


Figura 11. Esquema general para la obtención de un bioplaguicida.

Una vez definido el problema a abordar, en una primera etapa se debe llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos potenciales o candidatos para el control biológico de una determinada plaga o enfermedad; esta actividad se realiza aplicando técnicas de aislamiento convencionales que involucran numerosos muestreos en hábitats o microambientes específicos. Es importante conocer las técnicas de manipulación y transporte adecuados para evitar la pérdida de viabilidad o de características de interés de dichos microorganismos.

En una segunda etapa a nivel de laboratorio se lleva a cabo un *screening* o selección para conformar una colección de microorganismos que hayan demostrado tener el efecto o característica de interés; para esto es indispensable estandarizar una técnica de evaluación de “alto desempeño”, es decir, que permita de forma eficiente evaluar un número grande de muestras en un tiempo corto y con una inversión y estructura logística accesible. Una de las herramientas más usadas para llevar a cabo este tipo de estudios son las pruebas a nivel “micro”, en las que se adaptan

numerosas técnicas enzimáticas, inmunológicas o colorimétricas existentes al tamaño de una placa de 96 pozos o microplaca. De la cantidad y calidad de la información generada dependerá la correcta selección de candidatos para ser evaluados en etapas posteriores; el número de estos debe ser lo más reducido posible, ya que en las etapas posteriores se requiere de una inversión mayor en infraestructura y recursos económicos y humanos.

En una tercera etapa se realiza la producción masiva de los microorganismos seleccionados, lo que implica la obtención de cantidades de biomasa suficientes para evaluar simultáneamente la característica de interés mediante bioensayos a nivel de laboratorio o invernadero. Generalmente se lleva a cabo la evaluación de diferentes fuentes nutricionales para optimizar o alcanzar la máxima producción de biomasa, lo que implica la aplicación de estrategias de diseño de experimentos para hacer más eficiente esta actividad. En este punto alguno de los candidatos se descarta, dado que no se alcanzan los niveles de biomasa o concentración necesarios para formular un prototipo de bioproducto, estos valores se obtienen con bioensayos previos para determinar las dosis letales o efectivas del microorganismo sobre la plaga o enfermedad a controlar.

En una cuarta etapa se desarrolla un prototipo de formulación, que consta básicamente de la biomasa del microorganismo con la adición de una mezcla de excipientes o auxiliares de formulación que proveen características de estabilidad en almacenamiento, protección UV, tolerancia a condiciones ambientales u otra ventaja adicional. Esto requiere de la implementación simultánea de bioensayos para demostrar que la característica de interés del microorganismo no se ve afectada por la adición de estos componentes, lo que implica que se debe llevar a cabo una selección cuidadosa de estos y se debe contar con cierto grado de experticia para el montaje e interpretación de los ensayos experimentales. En general, dada la complejidad de los sistemas de formulación, en esta etapa se trabaja con un número muy reducido de candidatos que han superado todas las etapas anteriores.

Una vez surtidas estas cuatro etapas “biológicas” y “tecnológicas” se debe evaluar el prototipo de formulación en condiciones de la vida real, es decir en campo, no solo para demostrar la eficacia de la solución tecnológica generada sino para cumplir con algunos de los requisitos necesarios para el registro de un bioproducto. De ser necesario, en función de los resultados obtenidos se hacen nuevos ajustes en las etapas tecnológicas para alcanzar el nivel de control de la plaga o enfermedad en campo definida previamente; en este punto se debe tener en cuenta que el bioproducto aplicado presentará múltiples tipos de interacciones con factores bióticos y abióticos en el cultivo que hacen muy difícil la generación e interpretación de los resultados.

Solo si se han surtido exitosamente las cinco etapas previas, se estará en capacidad de surtir todos los requerimientos legales y de registro en Colombia, cuyo ente regulador es el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). Básicamente estas se refieren a demostrar la eficiencia del producto en cultivos monitoreados por el ICA para la expedición del registro de venta del producto y, si es el caso, se debe demostrar la capacidad técnica, de equipos e infraestructura si se desea obtener el registro de productor. Para el caso de bioproductos, los requerimientos operacionales son mucho más estrictos, dado que muchas de las etapas de producción requieren de condiciones especiales de asepsia, esterilidad y un control muy riguroso de variables tales como humedad, temperatura, luz, calidad del agua y vapor, entre otras; esto hace que los costos de inversión en una planta de producción sean más elevados.

En este contexto, la obtención de un bioplaguicida para el control del marchitamiento vascular de la uchuva causado por *Fusarium oxysporum* deberá surtir las mismas etapas y requisitos descritos. Sin embargo, este hongo patógeno ofrece unos retos biológicos y tecnológicos especiales dada su alta versatilidad fisiológica, que le permite la adaptación a diversas condiciones medioambientales y generar resistencia a corto plazo a la mayoría de los plaguicidas químicos, además de su capacidad de sobrevivir hasta 30 años en el suelo, ya que produce estructuras de resistencia. Por tanto, el bioproducto a desarrollar idealmente debe tener las siguientes características:

- Concentración óptima del ingrediente activo para asegurar su eficacia.
- Compatibilidad con algunos de los principales fungicidas y plaguicidas comúnmente usados en el cultivo de uchuva para permitir la integración en un Programa de Manejo Integrado del Cultivo (MIC).
- No presentar fitotoxicidad o algún otro tipo de efecto negativo sobre uchuva u otro cultivo.
- Elevada permanencia en el suelo manteniendo la viabilidad del ingrediente activo.
- Facilidad de aplicación en el suelo usando equipos convencionales.
- Facilidad de dosificación, dispersión o disolución.

Mediante la selección rigurosa del microorganismo biocontrolador, con el desarrollo de procesos eficientes de producción del ingrediente activo y una exhaustiva investigación en prototipos de formulación, en el Laboratorio de Control Biológico de Corpoica se solventaron algunos de los retos asociados a las seis características mencionadas. Esta investigación inicial que tomó 3 años, financiada por el MADR y Asohofrucol en el marco del proyecto “Estrategias de control biológico de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de uchuva (*Physalis peruviana*)”, permitió la obtención de tres prototipos de formulación a base de rizobacterias.

Uno de los prototipos, a base de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf014, se formuló en una presentación de líquido concentrado con una concentración de 1.49×10^{12} UFC/ml. Con este se alcanzó una germinación de semillas de uchuva del 93% en 17 días, mientras en el testigo no tratado la germinación fue inferior al 90%; también se observó una disminución de la incidencia de *F. oxysporum* en invernadero en un 17% y aumentó la producción de uchuva en campo en un 19.4% (alcanzando 19.3 t/ha-año), en comparación con el tratamiento agricultor.

El otro prototipo, a base de la rizobacteria *Bacillus* sp. Bs006, se formuló en una presentación de líquido concentrado con una concentración de 1.6×10^{11} UFC/ml y demostró ser estable en su viabilidad durante tres meses a temperatura de refrigeración (4°C) (Figura 12). Con este se alcanzó una germinación de semillas de uchuva del 90% en 20 días, mientras en el testigo no tratado la germinación fue inferior al 90% y se disminuyó la incidencia de *F. oxysporum* en invernadero en un 24%. Adicionalmente, aumentó la producción de uchuva en campo en un 48.4% (23.9 t/ha-año), en comparación con el tratamiento agricultor.

Sumado a lo anterior, se desarrolló un prototipo sólido para suspender en agua a base de la rizobacteria *Pseudomonas* sp. Pf014, que presentó adecuadas características microbiológicas y fisicoquímicas pero cuyo costo de producción fue el más elevado, por lo que solamente fue evaluado hasta nivel de invernadero (Figura 12).



Figura 12. Izq. Prototipo líquido a base de *Bacillus subtilis* Bs006. Der. Prototipo sólido a base de *Pseudomonas* sp. Pf014.

Los dos prototipos líquidos se encuentran en evaluación a través de un ciclo completo de cultivo de uchuva para determinar la relación beneficio/costo de esta tecnología, pero desde la primera cosecha han demostrado una reducción en los costos de aplicación y un aumento en los beneficios económicos para el agricultor. Simultáneamente se ha observado una incidencia de *F. oxysporum* menor al 15% después de 6 meses en un lote infestado en el que se había presentado incidencias de hasta el 80% del marchitamiento vascular.