

## Capítulo 11

---

# Diseño conceptual, selección y prueba de concepto de microorganismos biocontroladores

## Chapter 11

---

# Conceptual design, selection and proof of concept of biological control microorganisms

Alba Marina Cotes,<sup>1</sup> Xavier Fargetton,<sup>1</sup> Jürgen Köhl<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (AGROSAVIA)

<sup>2</sup> Wageningen Plant Research, Países Bajos

## Contenido

Introducción .....	598
Diseño conceptual .....	598
Descubrimiento de agentes de control biológico .....	600
Aislamiento y conservación de microorganismos .....	600
Identificación .....	601
Análisis de riesgo preliminar .....	601
Caracterización ecofisiológica .....	601
Modos de acción preliminares .....	602
Prueba de concepto .....	602
Actividad biocontroladora .....	602
Ensayos <i>in vitro</i> .....	603
Bioensayos <i>in vivo</i> .....	603
Tipos de bioensayo .....	603
Requerimientos para el desarrollo de bioensayos .....	608
Ensayos preliminares de producción masiva .....	608
Modos de acción .....	608
Efecto preliminar en organismos que no son plagas objetivo .....	609
Casos de estudio .....	609
Algunos desarrollos en Colombia .....	609
Biocomes: consorcio para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas en Europa .....	617
Definición del valor de la tecnología .....	619
Fase 1. Diseño de producto orientado hacia el mercado .....	619
Fase 2. Factores del negocio: propuesta de valor para el cliente .....	620
Fase 3. Estrategia de mercadeo .....	621
Fase 4. Entrada de negocios: entrega de valor .....	622
Conclusiones .....	623
Agradecimientos .....	623
Referencias .....	624

## Resumen

El objetivo final de un producto de biocontrol es su comercialización y uso por parte de los agricultores. El desarrollo y la puesta en el mercado de un nuevo producto es un proceso complejo que debe ser manejado de forma estructurada; en este proceso, los desarrolladores de bioplaguicidas deben integrar toda la cadena, desde la investigación básica y el desarrollo del producto hasta su comercialización. Es muy importante que los usuarios finales del futuro producto de biocontrol se encuentren en el centro del proceso de innovación, y con ese fin deben incluirse desde la concepción de la idea de un nuevo proyecto de investigación —en la que se hace el desarrollo conceptual del producto potencial—, durante la prueba de concepto, hasta el desarrollo del bioplaguicida. Conocer a los clientes objetivo, comprender sus prácticas actuales e identificar las tecnologías competitivas existentes y futuras proporciona al equipo de desarrollo pautas sólidas para enfocar su programa de investigación y desarrollo en las características del producto que tengan el potencial para entregar el mayor valor agregado a los usuarios finales de la tecnología. En el desarrollo de un nuevo bioplaguicida, es necesario evaluar un gran número de microorganismos candidatos para el control biológico en los programas de cribado (*screening*), pero la selección de agentes de control biológico para uso comercial debe cumplir muchos requisitos diferentes. Además de ser agentes activos contra un fitopatógeno específico o un insecto plaga, deben ser seguros, adecuados para el registro y rentables. En etapas tempranas, además de la eficacia, se deben considerar criterios importantes como el tamaño del mercado potencial, las características ecológicas del microorganismo, su capacidad preliminar de producción masiva en medios de bajo costo, los riesgos potenciales para usuarios y el medioambiente, así como las posibilidades de protección de los derechos de propiedad intelectual. El sistema de *screening* por etapas propuesto tiene como objetivo el uso comercial de los bioplaguicidas microbianos, el cual depende de los resultados de la investigación tanto fundamental como aplicada en el control biológico. Todas estas evaluaciones deben ser desarrolladas por un equipo interdisciplinario y altamente motivado, que incluya tanto a científicos con diferentes especialidades como a expertos en economía y mercadeo con experiencia industrial.

## Palabras clave

Bioplaguicida, control biológico, desarrollo de producto, mercado, valor agregado

## Abstract

The final objective of the development of a biocontrol product is its commercialization and use by growers. The complex process of developing and bringing the final product to the market must be managed in a clearly structured way. An interdisciplinary team should integrate the entire chain from basic research and development to commercialization. It is quite important that end-users of the future biocontrol product are involved in the center of the innovation process, starting with the conception of a new project of research, in which the conceptual design of the potential product is defined, followed by the proof of concept and finalized with the development of the biopesticide product. Knowing the targeted customers, understanding their current practices, and identifying the existing and future competitive technologies provide the development team with solid guidelines to focus its research and development program on product features that have the potential to deliver the highest added value to the end-users of the technology. For the development of a new biopesticide high numbers of candidate biocontrol microorganisms have to be evaluated in screening programs, but selection of biocontrol agents for commercial use have to fulfill many different requirements. Besides being active biocontrol agents against the specific targeted plant pathogen or pest insect, they must be safe, suitable for registration and cost effective. In early steps important criteria besides efficacy are potential market size, ecological characteristics, and preliminary production ability in low cost media, potential safety and environmental risks, as well as possibilities for protection of intellectual property rights. The proposed stepwise screening system aiming at commercial use of microbial biopesticides depends on results of fundamental and applied research on biological control. All these evaluations need to be driven by an interdisciplinary and highly motivated team which includes both scientists with different specialties and experts in economics and marketing with industrial know-how.

## Keywords

Added value, biological control, biopesticide, market, product development

## Introducción

Lograr que un microorganismo sea elegible para el desarrollo de un bioplaguicida implica esfuerzos conjuntos de un equipo interdisciplinario en el que participen expertos científicos, tanto en ciencias básicas como aplicadas, así como en economía y mercadeo, con experiencia (*know-how*) industrial.

Todos ellos trabajan en cuatro fases, que van desde el descubrimiento de un microorganismo con potencial biocontrolador; la obtención de un prototipo de producto; la generación de un producto optimizado, listo para su escalamiento industrial, hasta la ubicación del bioplaguicida en el mercado. Estas etapas incluyen: 1) diseño conceptual, 2) prueba de concepto, 3) desarrollo, 4) escalamiento y 5) registro y transferencia de la tecnología (figura 11.1).

En dichas fases es necesario el trabajo en equipo de expertos en fitopatología o entomología (según el caso), microbiología, agronomía, biología, biotecnología

industrial, biología molecular, análisis de riesgo en toxicología humana y ambiental, ingeniería bioquímica, química farmacéutica, economía y mercadeo con experiencia industrial.

La selección de un microorganismo apto para el desarrollo de un bioplaguicida requiere estudios básicos y aplicados, que le den fundamento al desarrollo del producto, por lo que, antes de iniciar este proceso, se deben definir varios aspectos científicos, tecnológicos y de mercado que constituyen requisitos para lograr perfeccionarlo y posicionarlo.

Varios autores han propuesto las diferentes etapas que se deben considerar en el desarrollo de agentes de control biológico como bioplaguicidas, así como las oportunidades actuales para su inclusión en el mercado (Köhl, Postma, Nicot, Ruocco, & Blum, 2011; Van Lenteren, Bolckmans, Köhl, Ravensberg, & Urbaneja, 2017).

## Diseño conceptual

Es la etapa en la que se concibe la idea de investigación, se analizan las demandas y necesidades del desarrollo del proyecto y se establecen las prioridades y las oportunidades para un nuevo bioplaguicida.

Para definir si se justifica hacer un nuevo desarrollo, un paso indispensable en la decisión del inicio del proceso de selección de biocontroladores es el estudio del cultivo, su importancia y las posibilidades de crecimiento, así como sus costos de producción y cómo inciden en ellos las alternativas tecnológicas disponibles.

Respecto a estas, y en particular para las mejores opciones de manejo disponibles, es necesario analizar sus beneficios y sus limitaciones, con el fin de que el producto que se pretende desarrollar tenga elementos de diferenciación frente a los ya existentes.

Otro aspecto importante es el impacto de la enfermedad o del insecto plaga en este o en otros cultivos

potenciales, así como las condiciones del mercado. En este último aspecto, se requiere precisar su tamaño, el espectro de cultivos en el que el agente de biocontrol podría usarse, el espectro de plagas que ha podido afectar y la consistencia de su efecto biocontrolador en condiciones de campo.

Además, se deben tener en cuenta aspectos tecnológicos, que incluyen las opciones de fermentación y de formulación, para que el producto sea fácil de aplicar y que preferiblemente no requiera cadena de frío para su transporte y almacenamiento. Esto es pertinente cuando se pretende hacer el nuevo desarrollo con microorganismos ya reportados por su actividad biocontroladora.

Por otra parte, un componente importante en el éxito de la tecnología que se pretende desarrollar es que no haya protecciones de propiedad intelectual que limiten su transferencia.



**Figura 11.1.** Fases para el desarrollo de un bioplaguicida microbiano.

Fuente: Elaboración propia

Por lo tanto, deben analizarse las patentes existentes para el o los agentes de biocontrol que se buscan o investigar sobre las tecnologías recomendadas para el

manejo de la plaga que se desea controlar, pues esta información es esencial para la patentabilidad del nuevo desarrollo.

## Descubrimiento de agentes de control biológico

La selección de un microorganismo biocontrolador implica el cumplimiento de diferentes etapas, que incluyen análisis de la información disponible y desarrollo de investigaciones biológicas. Estas llevan al desarrollo conceptual y a la prueba de concepto (figura 11.1), y serán descritas a continuación.

### Aislamiento y conservación de microorganismos

El proceso que lleva al descubrimiento de un agente de control biológico (ACB) inicia con el aislamiento, la identificación y la conservación de los microorganismos, así como la definición del tipo de propágulo que va a constituir el principio activo del bioplaguicida. Por ejemplo, en el caso de bacterias, se pueden considerar células vegetativas o esporas; en el caso de hongos (mohos), se pueden considerar conidios, blastosporas, clamidosporas, microesclerocios y micelios, entre otros, mientras que en el caso de levaduras se consideran sus células vegetativas.

El aislamiento de los microorganismos que tienen potencial como biocontroladores puede hacerse mediante métodos de conteo en placa, idealmente utilizando medios de cultivo selectivos para el tipo de microorganismo que se desee aislar, o empleando técnicas selectivas de aislamiento, como el choque térmico, para aislar bacilos esporulados, o el uso de temperaturas de incubación selectivas o de sustratos específicos.

El análisis se hace a partir de las muestras de donde se pretenden aislar los microorganismos (suelo, partes aéreas de la planta o insectos, entre otros). También existen varios métodos de aislamiento selectivo en función de procesos metabólicos que permiten obtener microorganismos biocontroladores, como en el caso de

microorganismos celulolíticos (Nannipieri et al., 2003) o de otros con características específicas.

Los microorganismos también pueden aislarse a partir de insectos (larvas o adultos) o de estructuras del fitopatógeno (como esclerocios), con el montaje en cámaras húmedas y el posterior aislamiento en medios de cultivo enriquecido o en medios selectivos, según el caso.

La selección de un medio apropiado para el aislamiento eficiente de microorganismos biocontroladores es un paso esencial en el proceso de control biológico, en el cual se deben considerar los siguientes factores: 1) la siembra de las concentraciones adecuadas de las suspensiones cuando se trata de conteo en placa, o de los fragmentos o propágulos adecuados cuando se hacen siembras directas; 2) el uso de un medio de cultivo eficiente, que considere el periodo de crecimiento de los agentes de control biológico que se quieren aislar y la potencial ocurrencia de contaminación en el proceso; 3) los biocidas (antibióticos o fungicidas) y las concentraciones que deben agregarse al medio de cultivo para mejorar la eficiencia en el aislamiento; 4) el pH del medio de cultivo, para procurar hacerlo selectivo al grupo de microorganismos que se busca (ácido para el aislamiento de hongos, básico para el de bacterias), y 5) los sustratos que le otorgan selectividad al medio (como quitina o celulosa).

Una vez aislados, los microorganismos deben ser conservados para asegurar su viabilidad durante largos periodos y garantizar su estabilidad genética y fisiológica, lo cual a su vez permitirá el mantenimiento de su actividad biocontroladora.

En términos generales, los métodos de conservación que garantizan la inactividad metabólica o latencia de los microorganismos son los recomendados por el consorcio Common Access to Biological Resources and Information (Cabri) (2017) o por otra red de colecciones de microorganismos: 1) la crioconservación,

que incluye el mantenimiento en nitrógeno líquido (-196 °C) o la conservación a temperaturas inferiores a -70 °C, y 2) las técnicas de secado, que comprenden liofilización (*freeze-drying*), secado por centrifugación (*spin freeze-drying*) y secado en líquido (*liquid-drying*).

Antes de su conservación, es necesario tener en cuenta el medio de cultivo en el que el microorganismo debe producirse. Durante el proceso de conservación se deben considerar la temperatura de congelamiento o de desecación (según el caso), los agentes de protección que se le adicionan (Hubálek, 2003) y las condiciones de rehidratación y cultivo para su reactivación (Morgan, Herman, White, & Vesey, 2006).

## Identificación

Todos los candidatos se identifican en lo que se refiere al género o la especie, con base en secuencias de ADN. La información generada de esta forma debe confrontarse con información morfológica, documentando todas las imágenes macroscópicas y microscópicas obtenidas en bases de datos.

En términos generales, las bacterias se identifican por secuenciación de las regiones 16S del ARNr (ribosomal) (Suhando, Kusumawardhani, & Aditiawati, 2016), mientras que la identificación de los hongos se suele hacer mediante la secuenciación de genes ribosomales, como ARNr 18S, y de sus espaciadores internos transcritos ITS (*internal transcribed spacer*) u otras regiones variables dentro de los genes conservados (Hadziavdic et al., 2014). En esta etapa, se deben excluir o tratar de forma diferencial las especies que ya están protegidas por patentes a nivel internacional.

## Análisis de riesgo preliminar

A pesar de los altos costos que implica la identificación de microorganismos, es posible tener una idea sobre los riesgos potenciales de un biocontrolador mediante el uso de la minería de datos, analizando los riesgos toxicológicos o ambientales reportados para estas especies. De ese modo se pueden seleccionar especies con un riesgo bajo o inexistente y reducir el número

de especies, lo cual a su vez evitará costos innecesarios relacionados con la evaluación de muchos aislamientos en bioensayos.

Mediante el análisis de información con base en datos médicos y microbiológicos (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen [DSMZ], 2017), y considerando regulaciones (Environmental Protection Agency [EPA], 2017; Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea, 2009), se determinan los riesgos potenciales de patogenicidad humana, alergenicidad y toxicidad (Brimner, & Boland, 2003), con el fin de excluir especies consideradas sospechosas por sus registros en la literatura médica.

Así mismo, consultando la información científica disponible, se establecen los riesgos de microorganismos que han sido reportados como patógenos de plantas, que presentan fitotoxicidad, que producen micotoxinas o que generan riesgos medioambientales. Si se advierten riesgos potenciales para los seres humanos, los cultivos, los animales o el ambiente, el microorganismo no se debe seleccionar para continuar con las siguientes etapas de desarrollo, ya que los costos de registro del producto serían excesivos y podría no obtenerse.

## Caracterización ecofisiológica

Para lograr el éxito del control biológico, es importante caracterizar tanto el sitio donde se llevará a cabo la aplicación del bioplaguicida (suelo, ambiente foliar) como las condiciones medioambientales en las que se desarrolla la planta (humedad, temperatura, radiación, régimen de lluvias y sus características [porte, dosel, tamaño de raíz, fenología]).

Además, es indispensable conocer la biología del patógeno o del insecto plaga que se pretende controlar, ya que, de acuerdo con esta información, se debe desarrollar una formulación que permita llegar a los sitios que lo requieren para prevenir los daños que pueden causar o para interrumpir su ciclo, además de definir cómo y dónde se debe hacer la aplicación del bioplaguicida.

De igual manera, es necesario conocer las características ecofisiológicas de los microorganismos potencialmente biocontroladores que han sido seleccionados en las

etapas previas, con el fin de definir el modo en que la temperatura, la humedad, el pH, la radiación ultravioleta, la actividad de agua ( $A_w$ ) y otros factores influyen su viabilidad y actividad biocontroladora, como en el caso de la adherencia de los microorganismos a las superficies foliares o de frutos, cuando van a ser usados en el manejo de patógenos foliares o de poscosecha, respectivamente.

Con la información mencionada, se establecen los parámetros de inestabilidad a los que se enfrentará el microorganismo cuando sea expuesto a condiciones de campo y de almacenamiento. De esta forma, en las etapas posteriores de desarrollo del producto se deben definir las condiciones o los adyuvantes que le confieran al microorganismo tolerancia frente a las condiciones adversas, así como estabilidad en el almacenamiento, facilidad de aplicación y alta efectividad, bajo parámetros de costo-efectividad.

## Modos de acción preliminares

En esta etapa, con base en información de la literatura (minería de datos), se deben analizar los modos de acción reportados de las especies seleccionadas como

potenciales biocontroladores, ya que en función de ello se direccionan los bioensayos para evaluar su actividad biocontroladora. Además, esta información permite establecer las condiciones de producción masiva y de aplicación del agente que optimicen su efecto.

Por ejemplo, el diseño de bioensayos para el control de fitopatógenos puede orientarse a la detección de hiperparásitos (Rocha et al., 2009; Smith et al., 2013), a la selección de microorganismos que compitan con el patógeno (Pliego et al., 2007), a la búsqueda de cepas hipovirulentas (Boland, 2004) o de aquellas que estimulen las respuestas de defensa en las plantas (Moreno et al., 2009).

Así mismo, para el control de insectos, el bioensayo depende de si el biocontrolador actúa mediante ingestión, ya que produce las toxinas causantes de su efecto de control mayoritario, como sucede con *Bacillus thuringiensis* (Navon, 2000) o con baculovirus (Cuartas, Villamizar, Espinel, & Cotes, 2009; Espinel-Correal et al., 2012; Gómez, Villamizar, Espinel, & Cotes, 2009), o si penetra a través del tegumento del insecto (Espinel, Ebratt, & Cotes, 1998; Espinel, Torres, & Cotes, 2009). También debe considerarse si el microorganismo actúa de forma endofítica o ectofítica.

## Prueba de concepto

La prueba de concepto es la demostración del potencial práctico de un agente de control biológico. En el caso del desarrollo de bioplaguicidas, se deben surtir las etapas que se explican a continuación.

## Actividad biocontroladora

Antes de definir los microorganismos potencialmente biocontroladores que van a ser evaluados, se deben establecer criterios de preselección para que solo los candidatos adecuados se sometan a bioensayos, que se utilizan para la detección de aislamientos microbianos que puedan ejercer un control eficiente. Estos difieren si se trata de enfermedades o de insectos plaga. Pueden

excluir al huésped (*in vitro*) o incluirlo (*in vivo*) y deben ser confiables, capaces de producir resultados que puedan analizarse estadísticamente y simples para realizarlos fácilmente en el laboratorio.

El requisito principal para un bioensayo es que la planta huésped o su tejido, el fitopatógeno o insecto plaga y el microorganismo biocontrolador interactúen en condiciones controladas, las cuales deben ser representativas tanto de la etapa epidemiológica específica como de las condiciones ambientales en las que el cultivo se desarrolla.

Un bioensayo potente suele requerir largos periodos de tiempo y depende de la experiencia de profesionales expertos en fitopatología, entomología y microbiología.

## Ensayos *in vitro*

Estos ensayos se consideran muy preliminares y no determinantes de la actividad biocontroladora, y se desarrollan frecuentemente en cajas de Petri que contienen medios nutritivos para identificar actividad antagonista entre un microorganismo biocontrolador y un patógeno (antibiosis, hiperparasitismo o competencia). Sin embargo, varios estudios han demostrado una escasa correlación con los ensayos desarrollados *in situ* (Reddy, Hynes, & Lazarovits, 1994; Sharifi-Tehrani, Zala, Natsch, Moënné-Loccoz, & Défago, 1998).

También se usa la detección de metabolitos, como en el caso del diacetylphloroglucinol, producido por *Pseudomonas* spp., en el que se ha encontrado una correlación significativa entre la cantidad de metabolito producido y la protección obtenida en algunos patosistemas, así como en el tomate se ha encontrado que el control de *Fusarium oxysporum* (Sharifi-Tehrani et al., 1998) y de *Pythium splendens* en el frijol (Cotes, Lepoivre, & Semal, 1996) también tienen una alta correlación con las actividades de celulasa,  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa, producidas por cepas de *Trichoderma* spp.

El desarrollo de bioensayos para el control de fitopatógenos exige que se disponga de un aislamiento patogénico con demostrada virulencia, el cual debe ser conservado siguiendo los mismos parámetros mencionados para los agentes biocontroladores. Dichos bioensayos se diseñan para propósitos específicos relacionados con las características de la plaga.

En el caso de enfermedades, se debe considerar el método de aplicación del agente de biocontrol y su modo de acción. Por ejemplo, los diseños difieren si se trata de una enfermedad causada por un hongo del suelo, por patógenos transmitidos por semillas o un patógeno foliar.

En lo que se refiere a los bioensayos para el control de insectos, la selección de microorganismos entomopatógenos con frecuencia se hace usando dietas artificiales en las que se desarrollan las larvas y en las que la bacteria (Butt, & Goettel, 2000), el virus o el hongo biocontrolador causan la muerte del insecto al infectarlo (Navon, 2000). Este método ha demostrado ser efectivo para la selección de biocontroladores que tienen efecto en condiciones de campo (Bosa, & Cotes, 1997).

También se ha utilizado quitina como blanco metabólico para seleccionar aislamientos efectivos, como en el caso de *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Nomuraea rileyi* para el control de *Helicoverpa armigera* en el garbanzo (Deshpande et al., 2003; Nahar, Ghormade, & Deshpande, 2004).

## Bioensayos *in vivo*

Es común usar plántulas y órganos como semillas, raíces, tubérculos, hojas, flores o frutos esterilizados sobre agar agua o en una cámara húmeda para realizar bioensayos que se asemejen a las condiciones naturales en las que el patógeno o el insecto producen daño. Se suelen utilizar explantes (pétalos, discos de hojas o porciones de tallo o de fruto). Sin embargo, son ensayos de corta duración, que se utilizan para un tamizaje (*screening*) rápido.

Los bioensayos más habituales usan plantas en materas. Tienen ventajas respecto a los anteriores, pues les confieren condiciones cercanas a las naturales de los biocontroladores, del insecto plaga o del fitopatógeno, pues se aproximan aún más a la realidad del cultivo, ya que en este la planta posee todos sus órganos intactos, permite una aplicación del biocontrolador de manera similar a como se haría en campo (al suelo o al follaje) y se puede extender el tiempo de evaluación y analizar el efecto residual del biocontrolador.

Los ensayos de semicampo, como los que se hacen en invernaderos o cámaras climatizadas y en los que se utilizan condiciones controladas, son esenciales para demostrar que los microorganismos seleccionados en laboratorio son eficaces en las condiciones normales del cultivo.

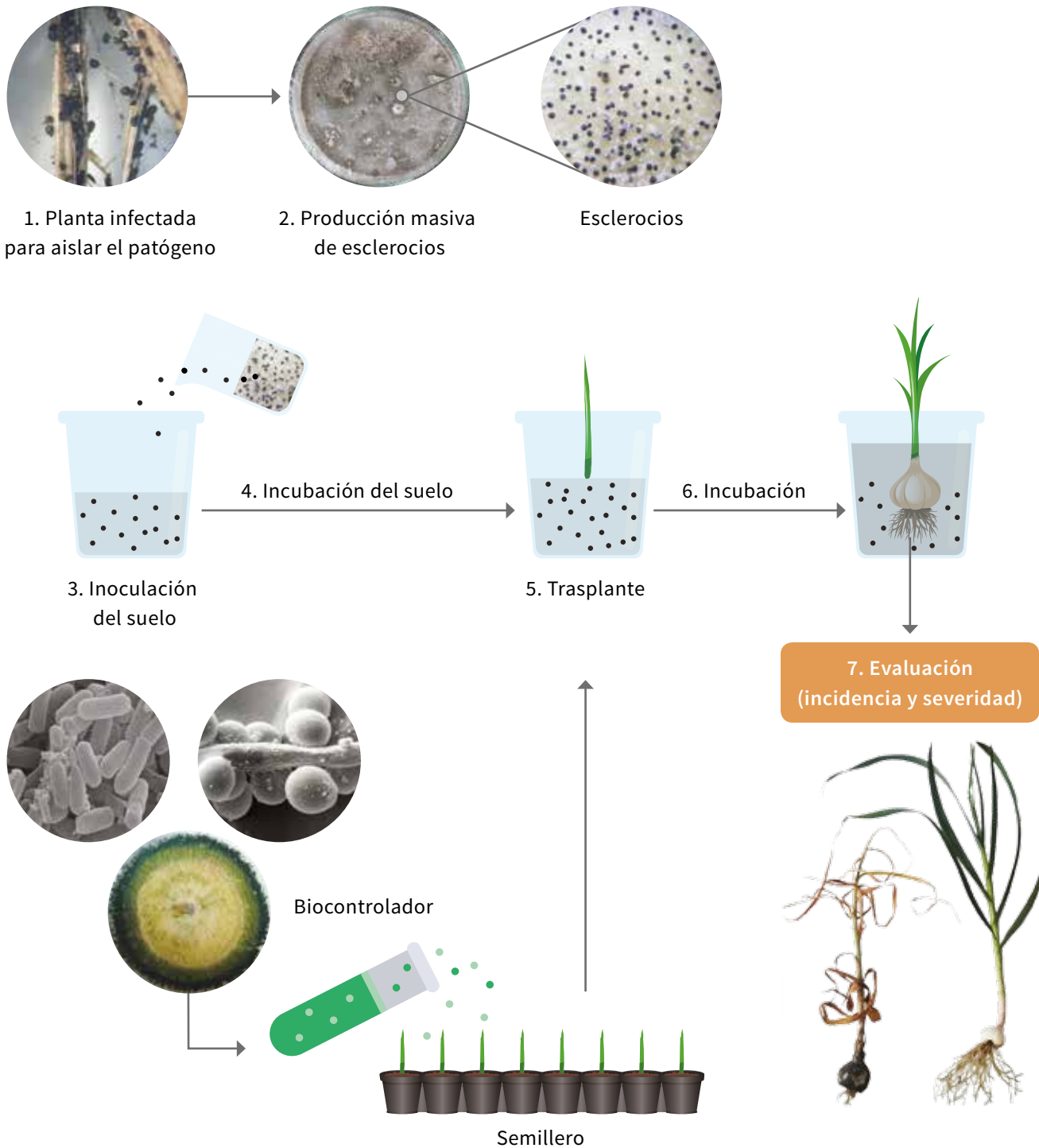
## Tipos de bioensayo

Los bioensayos no se realizan solamente para seleccionar microorganismos con actividad biocontroladora, evaluando muchos en una sola concentración y midiendo su actividad en un tiempo definido, también se llevan a cabo para determinar la dosis-respuesta; en este caso, el microorganismo que ejerza

un control efectivo con la menor concentración es el más deseable para el desarrollo de un bioplaguicida, en términos ecológicos y económicos.

Otros bioensayos determinan el tiempo de respuesta: miden la velocidad en la que un biocontrolador ejerce

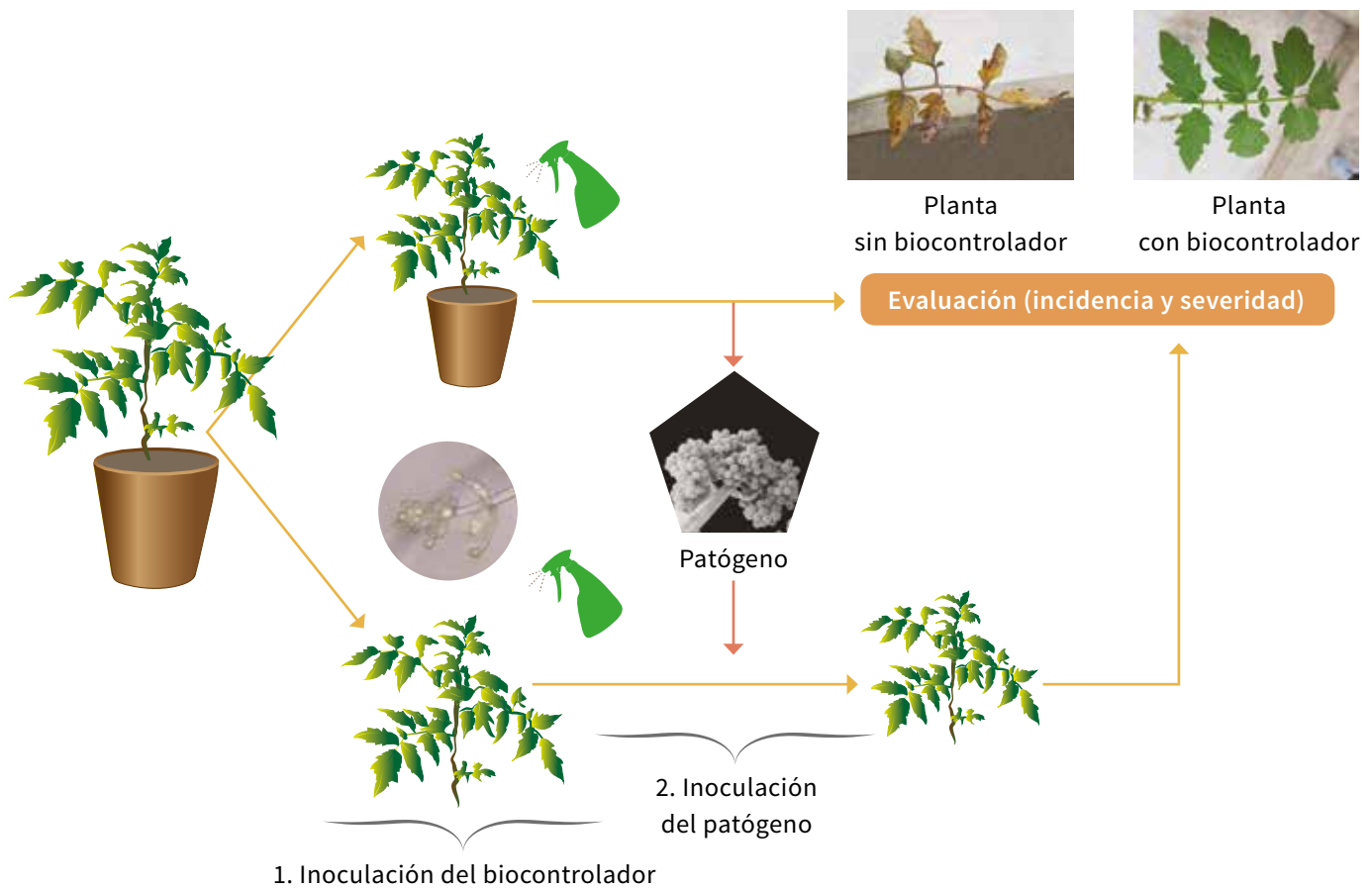
su actividad, pues este también es un criterio de selección importante, ya que un microorganismo que actúe rápido tiene más posibilidades de ejercer un control efectivo en condiciones de campo (figuras 11.2, 11.3, 11.4, 11.5 y 11.6).



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.2.** Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos del suelo. Caso: evaluación de diferentes microorganismos para el control del moho blanco *Sclerotium cepivorum* en el ajo.

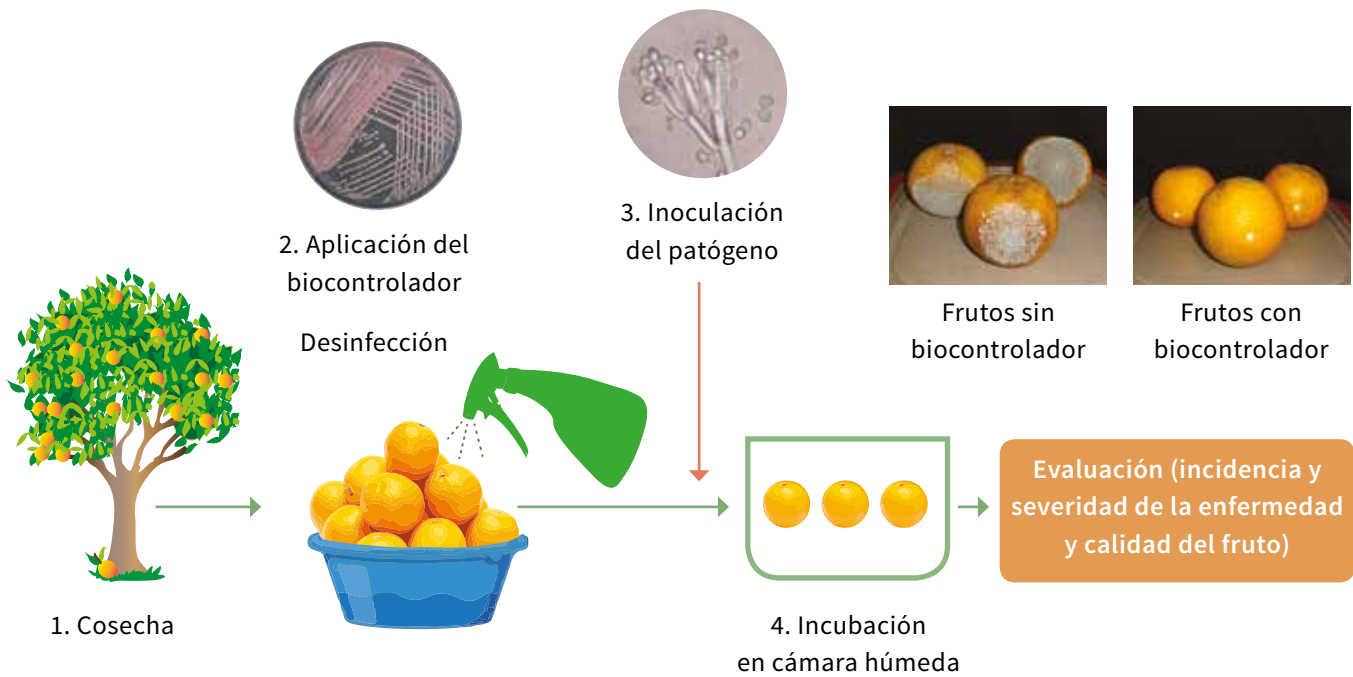
Fuente: Elaboración propia



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.3.** Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos foliares. Caso: *Trichoderma* spp. para el control del moho gris *Botrytis cinerea* en el tomate.

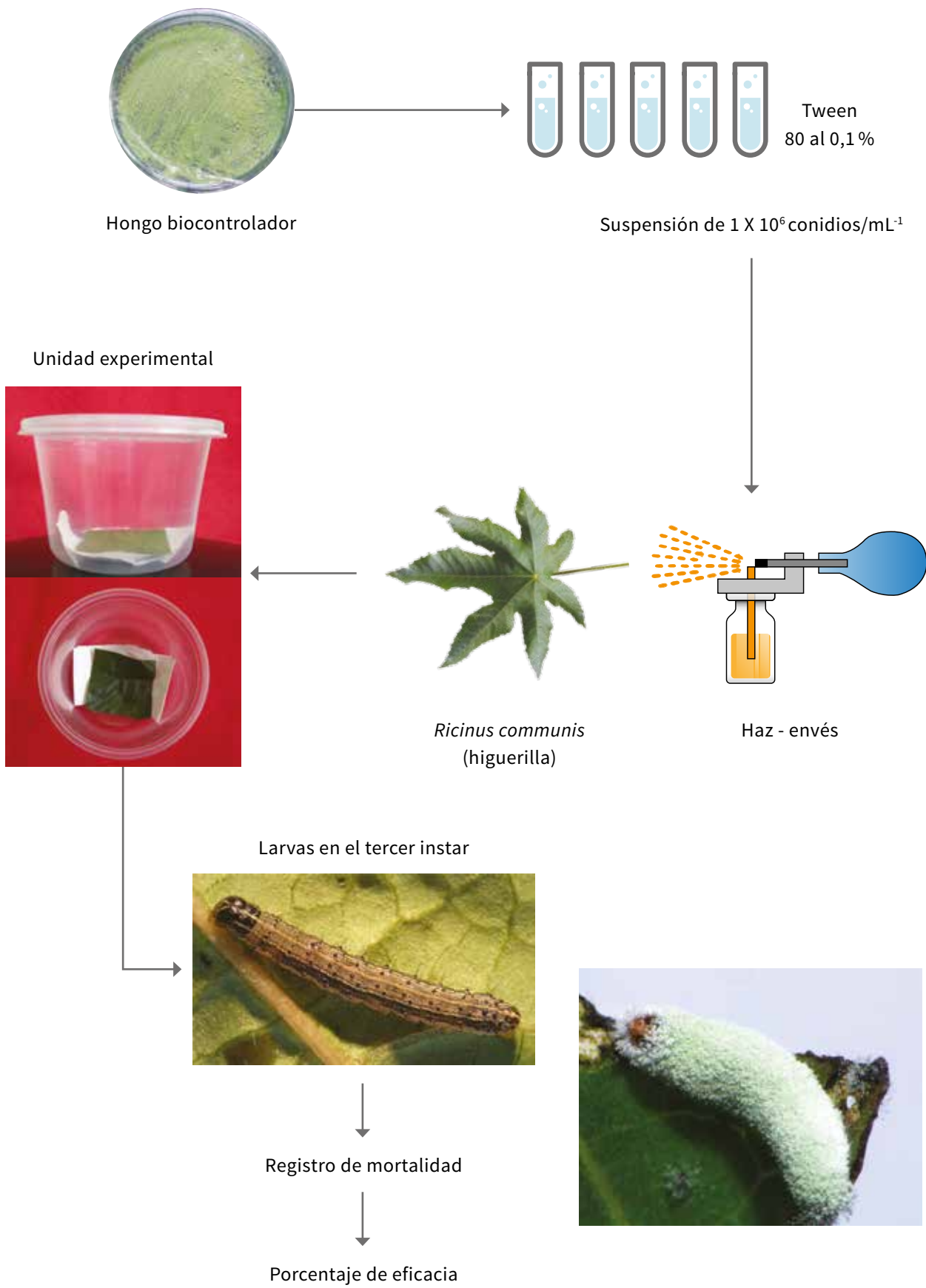
Fuente: Elaboración propia



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

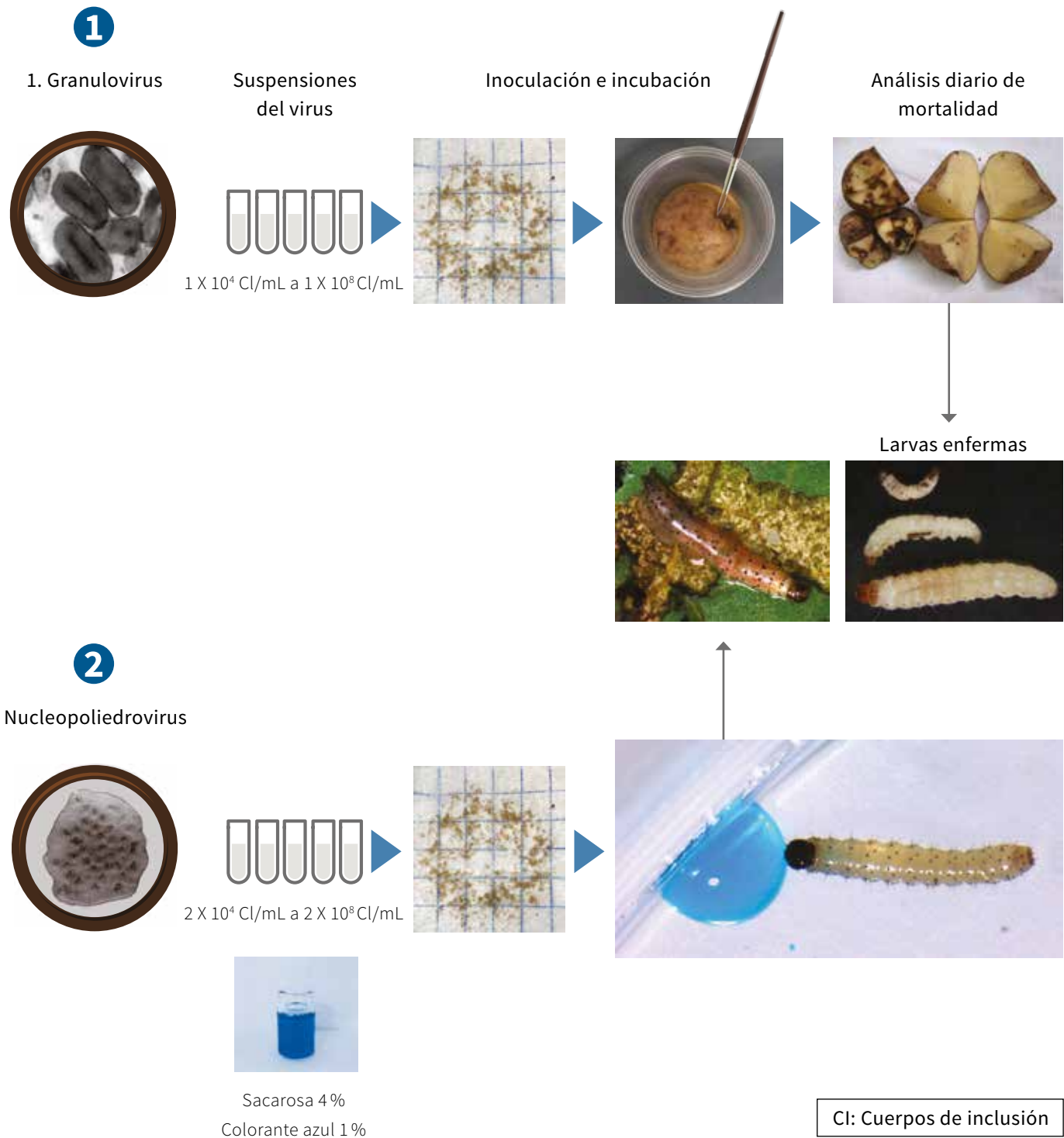
**Figura 11.4.** Ejemplo de bioensayo para seleccionar biocontroladores de patógenos en poscosecha. Caso: levaduras para el control del moho verde de la naranja.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 11.5.** Ejemplo de bioensayo para seleccionar hongos entomopatógenos para el control de insectos plaga. Caso: *Metarhizium rileyi* para el control de *Spodoptera frugiperda*.

Fuente: Elaboración propia



**Figura 11.6.** Ejemplo de bioensayo para seleccionar virus entomopatógenos para el control de insectos plaga. Caso 1: granulovirus para el control de la polilla guatemalteca de la papa *Tectia solanivora*; Caso 2: nucleopoliedrovirus para el control de *S. frugiperda*.

Fuente: Elaboración propia

## Requerimientos para el desarrollo de bioensayos

Para lograr el éxito de un bioensayo deben considerarse varios aspectos. Es necesario asegurarse de que el potencial biocontrolador no haya perdido su actividad debido al cultivo continuado, así como garantizar que el inóculo que se va a evaluar esté viable. Con ese fin, es deseable el uso de técnicas de conteo en placa para bacterias, levaduras y mohos, aunque se pueden usar análisis de la germinación, para el caso de conidios fúngicos, o colorantes vitales, como el verde Jano y el azul de metileno.

El blanco de control debe estar sano si se trata de insectos, o estar viable y ser virulento si se trata de fitopatógenos. Así mismo, se requiere que las plantas o los explantes que se utilicen estén sanos. Es necesario que las condiciones del bioensayo (temperatura y humedad, entre otras) sean óptimas, para que la interacción se produzca.

También es ideal que se consideren las fluctuaciones medioambientales que se producen en campo. Es indispensable que el número de repeticiones y de réplicas en el tiempo sean suficientes para garantizar la consistencia de los resultados, y el diseño experimental debe ser adecuado a las condiciones del ensayo, para obtener resultados estadísticamente representativos.

## Ensayos preliminares de producción masiva

En esta etapa se considera un número limitado de candidatos, seleccionados en las etapas previas. Antes de iniciar este proceso, es necesario definir qué tipo de propágulo va a constituir el principio activo del producto; por ejemplo, en el caso de bacterias, se pueden considerar células vegetativas o esporas, y en el de hongos conidios, clamidosporas o micelio, entre otros.

Dado que el éxito comercial de un bioplaguicida requiere producir el propágulo definido en grandes cantidades, con óptima actividad biocontroladora y a bajo costo, se deben realizar estudios preliminares

que permitan establecer la viabilidad del microorganismo para su producción masiva.

A partir de la información fisiológica obtenida para cada biocontrolador en relación con la temperatura y los pH de crecimiento óptimos, la actividad de agua ( $A_w$ ), su capacidad para asimilar diferentes sustratos (fuentes de carbono o nitrógeno) y la definición de los macro y microelementos necesarios para su desarrollo, se recomienda diseñar uno o varios medios de cultivo, basados en sustratos de bajo costo y disponibles localmente, en los que los rendimientos sean reproducibles en la producción masiva, al igual que la actividad biocontroladora de los propágulos producidos.

Para llevar a cabo esta etapa, inicialmente se pueden usar medios sólidos en cajas de Petri o medios líquidos en frascos Erlenmeyer o en sistemas de microfermentación (microplacas). En esta fase se definen parámetros de los propágulos que se hayan considerado para las etapas posteriores, como tiempos de duplicación, velocidad de crecimiento y rendimiento. Los resultados aquí obtenidos permiten excluir microorganismos que presenten dificultades para su producción o aquellos en los que esta última no resulte costoefectiva.

## Modos de acción

El conocimiento sobre el modo de acción de los microorganismos biocontroladores es un requisito previo para el desarrollo y registro de un bioplaguicida. Varios mecanismos, que actúan de forma individual o simultánea, son importantes en las interacciones entre los agentes de control biológico, su blanco de control (fitopatógeno o insecto) y la planta hospedera. Sin embargo, estos modos varían significativamente, dependiendo del grupo taxonómico del biocontrolador.

En general, los microorganismos utilizados para el control de enfermedades ejercen una amplia gama de modos de acción, clasificados en dos tipos: en el primero, los antagonistas microbianos ocupan el mismo nicho ecológico del fitopatógeno y actúan directamente con él, mediante mecanismos como el parasitismo, la competencia por espacio, agua o nutrientes, o a través de la producción de antibióticos, otras moléculas u otros metabolitos secundarios que afectan al patógeno objetivo.

En el segundo tipo, los antagonistas microbianos ejercen efectos indirectos en la planta huésped, estimulando respuestas de defensa de esta. Aunque la resistencia inducida puede emplearse también para el control de insectos, por lo general el enfoque para controlarlos hace referencia a los microorganismos que parasitan a los insectos plaga o a aquellos que producen toxinas, causándoles la muerte en ambos casos.

Los modos de acción son discutidos en detalle en los capítulos de este libro relacionados específicamente con los diferentes tipos de biocontrol (capítulos 1 al 7).

## Efecto preliminar en organismos que no son plagas objetivo

El desarrollo de una estrategia de control biológico que pueda hacer parte de un manejo integrado del cultivo requiere la integración de todos los componentes de tal manejo. Esto implica que varios agentes pueden actuar juntos en un mismo cultivo, lo cual requiere un profundo conocimiento de sus interacciones, por lo que resulta muy importante conocer la compatibilidad entre los diferentes agentes de control.

Por ejemplo, se debe conocer la compatibilidad entre los microorganismos entomopatógenos y los insectos benéficos que se utilicen para el control de un mismo u otros insectos plaga del cultivo; aquella entre tales microorganismos y los biocontroladores de fitopató-

genos, así como entre los diferentes microorganismos biocontroladores y los biofertilizantes que se apliquen en los mismos sitios (semillas, suelo o área foliar, entre otros) (Brimner, & Boland, 2003; Roychowdhury, Paul, & Banerjee, 2014).

A menudo, la introducción de cualquier organismo en el ambiente es un paso irreversible que debe hacerse con cautela, para evitar que interfiera con el funcionamiento natural de otros agentes de control de plagas o que cause problemas en las especies que no son blanco. Por tal razón, es necesario que el uso seguro de los microorganismos biocontroladores sea considerado en todos los niveles, sean efectos directos o indirectos (Hajek, & Goettel, 2000).

Por otra parte, ha sido ampliamente reconocido que el empleo de un solo agente de control biológico no puede proveer una regulación suficiente o satisfactoria de las poblaciones de la plaga (Roselyne, 2005), mientras que, cuando dos o más especies con propiedades reconocidas en esa función son seleccionadas por su compatibilidad para interactuar juntas, las deficiencias o limitaciones de las especies individuales podrían ser compensadas por otros miembros del grupo de organismos benéficos para el cultivo (como polinizadores, depredadores, parasitoides o microorganismos biocontroladores).

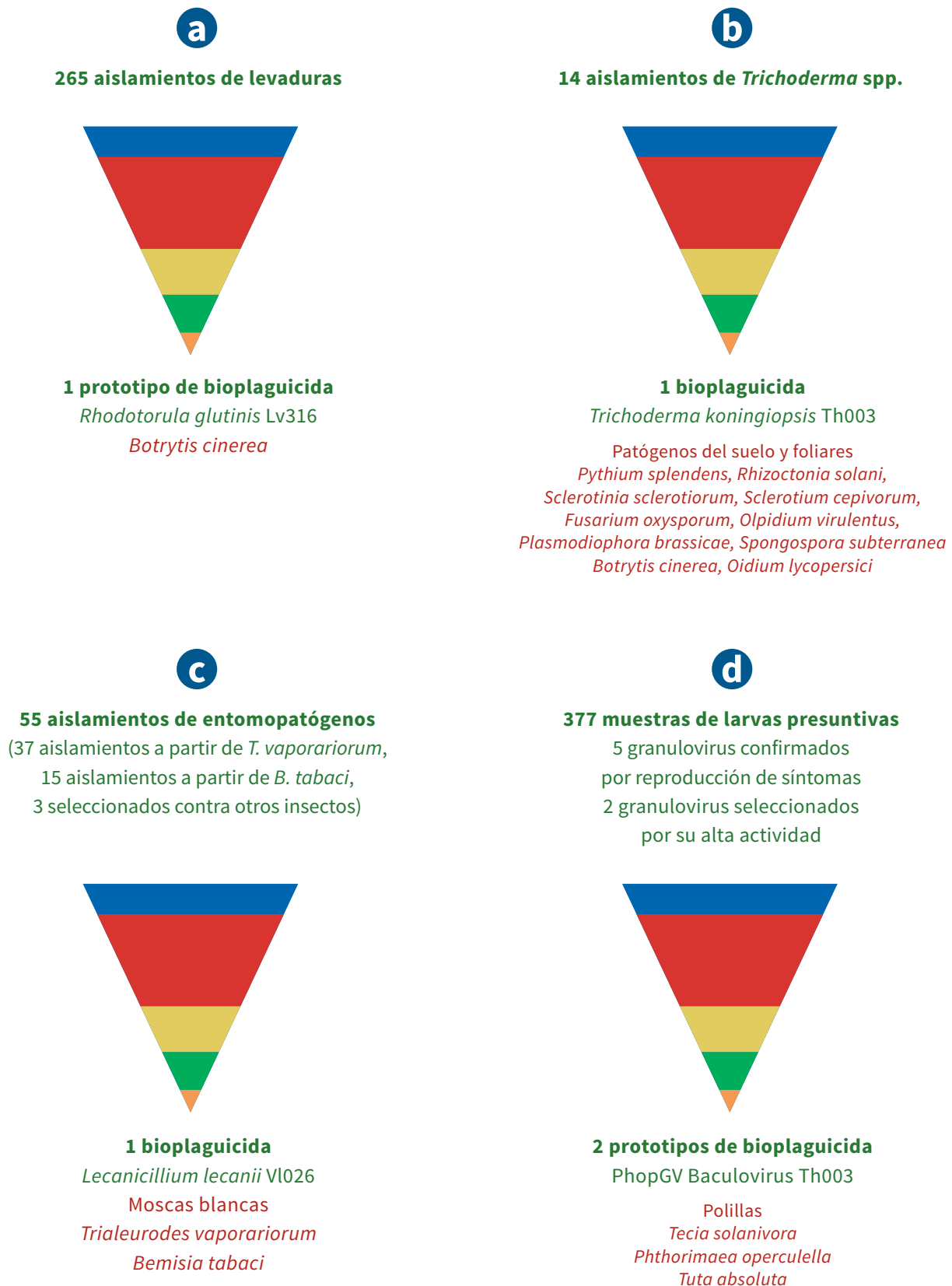
Por lo tanto, es indispensable establecer de forma preliminar la compatibilidad entre el microorganismo biocontrolador seleccionado y aquellos agentes que se consideren esenciales para el cultivo.

## Casos de estudio

A continuación, se describirán cinco casos de estudio, de los cuales cuatro corresponden a investigaciones desarrolladas en Colombia por la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica, actualmente AGROSAVIA), que permitieron la selección de microorganismos que constituyen el principio activo de bioplaguicidas (figura 11.7). El último caso corresponde a investigaciones recientemente desarrolladas en Europa por un consorcio integrado por instituciones de investigación e industria.

### Algunos desarrollos en Colombia

Desde sus inicios, el grupo de control biológico de AGROSAVIA decidió abordar la problemática fitosanitaria de diferentes cultivos priorizados en Colombia, mediante el desarrollo de bioplaguicidas con altos estándares de calidad. Con este fin, se definió una estrategia de selección de los microorganismos



**Figura 11.7.** Del aislamiento a la selección de biocontroladores con potencial para el desarrollo de bioplaguicidas. a. Selección de *R. glutinis* para el control de *B. cinerea*; b. Selección de *T. koningiopsis* para el control de patógenos foliares y del suelo; c. Selección de *L. lecanii* para el control de moscas blancas; d. Selección de un PhopGV granulovirus para el control de polillas (Lepidoptera: Gelechiidae).

Fuente: Elaboración propia

elegibles para el desarrollo de productos formulados, basada en los criterios antes descritos (figura 11.1).

## Levaduras para el control biológico de *Botrytis cinerea*

*Botrytis cinerea* es considerado el segundo patógeno más importante a nivel mundial, debido a su impacto en diferentes áreas, su amplio espectro de huéspedes, los daños severos que causa y por afectar tanto en campo como en poscosecha (Dean et al., 2012). Este patógeno causa la enfermedad conocida como moho gris, por su condición de hongo necrótrofo es incapaz de ocupar células vegetales vivas y coloniza tejidos muertos, a través de la producción de diferentes metabolitos fitotóxicos y proteínas (Van Baarlen, Woltering, Staats, & Van Kan, 2007).

Con el propósito de desarrollar una alternativa de control biológico de esta enfermedad, a partir de la filósfera de mora, se aislaron y caracterizaron 265 levaduras, teniendo en cuenta criterios como su capacidad de crecer en un pH de entre 3 y 9, a temperaturas entre 5 °C y 37 °C y en condiciones de baja actividad de agua (*Aw*). También se determinó su tolerancia a luz ultravioleta UVB y su adherencia a pétalos de rosa.

Así mismo, se identificaron su velocidad de crecimiento, tiempo de duplicación y capacidad de asimilar diferentes fuentes de carbono y nitrógeno. De este grupo se seleccionaron 100 aislamientos, los cuales toleraron amplios rangos de pH y temperatura. En este caso, se eligieron aquellos que presentaron la habilidad de crecer entre 5 °C y 30 °C y que no lo hicieron a 37 °C para evitar riesgos de patogenicidad en humanos.

Este grupo de levaduras fue sometido a un *screening* rápido (bioensayo) para determinar su actividad biocontroladora en pétalos de rosa variedad Vendela. Los 50 aislamientos seleccionados en la etapa anterior se caracterizaron metabólicamente, y se escogieron 16, capaces de reducir la incidencia del moho gris entre un 60 % y un 80 %, y fueron identificados molecularmente.

Mediante una matriz de decisión, se seleccionó la levadura Lv316, por presentar las mejores características,

como alta actividad biocontroladora (reducción de la incidencia en un 80 % y de la severidad en un 92 %), tolerancia a la luz UVB del 25 %, adherencia del 99 % a los pétalos de rosa, rápida velocidad de crecimiento, expresada como velocidad específica y tiempo de duplicación ( $\mu_{max}$ , h-1: 0,36, y tD, h-1: 1,89), y versatilidad metabólica. Con este aislamiento se desarrolló un medio de cultivo de bajo costo.

De igual forma, al realizar análisis preliminares sobre sus posibles modos de acción, los riesgos de patogenicidad en humanos y de producción de toxinas, se escogió esta levadura, Lv316, identificada como *Rhodotorula glutinis*, como la candidata ideal para el desarrollo de un bioplaguicida (figuras 11.7a y 11.8), cuyo producto consistió en una suspensión concentrada. Varios de los resultados descritos han sido publicados (Cotes et al., 2011; Zapata, Acosta, Díaz, Villamizar, & Cotes, 2011; Zapata et al., 2013, 2016).

## Hongo nativo *Trichoderma koningiopsis* en el control biológico de fitopatógenos

A pesar del potencial de *Trichoderma* spp. en el control biológico de enfermedades, no todas las especies ni todas las cepas de una misma especie son eficientes como agentes de control biológico. Por lo tanto, se requiere un trabajo minucioso que permita evaluar diferentes aislamientos y seleccionar el que presente una mayor y consistente actividad biocontroladora.

De ese modo, al evaluar esa actividad en 14 aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *P. splendens* en frijol, mediante ensayos en materas que contenían suelo sin esterilizar, se seleccionó el aislamiento nativo Th003, identificado como *Trichoderma koningiopsis* (antes *Trichoderma koningii*), por ejercer un efecto de biocontrol del patógeno superior al 70 % (Cotes et al., 1996) (figura 11.7b).

Con el propósito de determinar el efecto directo de este aislamiento de *T. koningiopsis* en estructuras de resistencia de patógenos, se evaluó la respuesta de esclerocios de *Rhizoctonia solani* al ser inoculados con el biocontrolador, y se demostró que puede actuar como micoparásito, ya que colonizó los esclerocios y afectó su viabilidad, lo que produjo una baja germinación,

del 5 % en suelo estéril y del 15 % en suelo no estéril, en comparación con los esclerocios no tratados con el biocontrolador, que tuvieron porcentajes de germinación de un 85 % y un 90 % respectivamente. Así mismo, se produjo degradación de dichos esclerocios, con valores de un 75 % y un 80 % respectivamente, mientras que en el testigo no tratado no se observó ninguna degradación (Beltrán, Cotes, & París, 2007).

Este aislamiento fue caracterizado metabólicamente y ecofisiológicamente, y demostró su gran versatilidad de crecimiento frente a diversas fuentes simples y complejas de carbono y nitrógeno. También se evaluó el efecto de polímeros adicionados como aditivos al medio de cultivo, y varios de ellos mejoraron su actividad biocontroladora.

Este aislamiento también mostró adaptación para crecer en un amplio rango de pH (desde 3,5 hasta 8,5), con un óptimo desarrollo de entre 4,5 y 6,5. Cuando se incubó en la oscuridad, con doce horas de luz y doce de oscuridad, su crecimiento micelial no se vio afectado, pero hubo una respuesta en su esporulación, que fue mayor en las condiciones de luz (constante o parcial). Aunque demostró capacidad para crecer y esporular a bajas y altas temperaturas (15 °C y 30 °C), su nivel óptimo se observó entre 20 °C y 25 °C. Por otra parte, al evaluar el efecto de la luz UVB, se encontró una susceptibilidad mediana.

Con base en los resultados obtenidos, se desarrolló un medio de cultivo de bajo costo que contiene un aditivo que estimula su actividad biocontroladora. Además, se generó la información necesaria para el desarrollo de dos prototipos de formulación, que consisten en un polvo mojable y en gránulos dispersables (Santos, García, Cotes, & Villamizar, 2012).

En primera instancia, se decidió registrar en Colombia el polvo mojable, en el cual los conidios fueron protegidos contra la radiación ultravioleta (UVB). Además, se optó por el licenciamiento de la tecnología de formulación en gránulos dispersables a la compañía brasilera Grupo Farroupilha, que fue recientemente adquirida por la canadiense Lallemand.

Dado que una característica deseable en el control biológico es que los microorganismos seleccionados tengan la capacidad de controlar varios patógenos, este aislamiento de *T. koningiopsis*, Th003, se evaluó

en otros patosistemas y demostró un amplio espectro en su actividad biocontroladora, si se tiene en cuenta que se obtuvo entre el 70 % y el 90 % de control en los siguientes patosistemas: *P. splendens* en pepino (Jacqmin, Cotes, Lepoivre, & Semal, 1993); *R. solani* en tomate (Cotes, Cárdenas, & Pinzón, 2001), frijol (Cotes et al., 1996) y papa (Beltrán, Moreno, Blanco, Villamizar, & Cotes, 2012); *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en tomate (Cotes et al., 2001; Moreno et al., 2009) y uchuva (Díaz et al., 2013); *B. cinerea* y *Oidium lycopersici* en tomate (Moreno et al., 2009), y *Sclerotinia sclerotiorum* en lechuga (Cotes, Moreno, Molano, Villamizar, & Piedrahita, 2007).

Adicionalmente, ha demostrado resultados de control cercanos al 50 % en los patosistemas *Olpidium virulentus* en lechuga (Cotes et al., 2012), *Plasmodiophora brassicae* en repollo (Botero, 2016) y *Spongospora subterranea* en papa (Mesa, 2017) (figuras 11.7b y 11.9).

Dichos modelos han involucrado actividades en el ámbito del laboratorio, pruebas experimentales en invernadero en condiciones controladas y en cultivos comerciales en plena exposición y en invernadero. Este microorganismo constituye el principio activo de un bioplaguicida registrado en el mercado colombiano denominado Tricotec®.

### Hongo nativo *Lecanicillium lecanii* en el control de las moscas blancas *Trialeurodes vaporariorum* y *Bemisia tabaci*

Las moscas blancas (Hemiptera: Aleyrodidae) son pequeños insectos fitófagos de plantas herbáceas, arbustos, árboles, plantas silvestres y cultivos de importancia económica. Se han convertido en un serio problema, y debido a daños directos que provocan al succionar la savia y por la transmisión de virus. *B. tabaci* y *T. vaporariorum* constituyen las especies cuya afectación reviste una mayor importancia económica (Byrne, Bellows, & Parrella, 1990).

Con el fin de obtener un entomopatógeno eficaz en el control de *T. vaporariorum*, se aislaron 37 cepas, a partir de individuos de este insecto obtenidos de cultivos comerciales, y todas fueron identificadas como

*L. lecanii*. La evaluación de la actividad biocontroladora se llevó a cabo mediante ensayos en invernadero sobre ninfas de segundo instar, utilizando como sustrato alimenticio plantas de frijol sembradas en materas.

Se seleccionaron las dos cepas que presentaron los mayores niveles de infección en ninfas, y se incluyeron en un nuevo experimento, para determinar su dosis letal 50 ( $CL_{50}$ ), la cual fue de  $4,92 \times 10^8$  conidios/ $ml^{-1}$  y  $1,75 \times 10^8$  conidios/ $ml^{-1}$ , respectivamente.

Al evaluar la susceptibilidad de los instares ninfales II, III y IV, y del estado adulto de la mosca blanca a la  $CL_{50}$ , definida para cada aislamiento, se seleccionó la cepa VI026, ya que mostró los mayores niveles de control en el menor tiempo, pues en 13 días se observaron niveles de infección ( $>50\%$ ), así como los menores niveles de adultos emergidos ( $<40\%$ ) en el segundo instar ninfal (García, 1996).

Por otra parte, con el fin de seleccionar entomopatógenos para el control de *B. tabaci*, mediante el mismo modelo de bioensayo, se evaluaron 15 aislamientos nativos, provenientes de adultos de *B. tabaci* recolectados en cultivos comerciales en diferentes zonas agroecológicas del país, que fueron identificados como *B. bassiana* e *Isaria* spp.

En estos se evaluó su actividad biocontroladora, junto con ocho aislamientos seleccionados en estudios previos por su alta actividad en otros insectos, como en el caso de *L. lecanii* VI026, arriba elegido para el control de *T. vaporariorum*, y de otros tres aislamientos, uno perteneciente a *B. bassiana*, escogido para el control del gusano blanco de la papa, *M. anisopliae*, seleccionado para el control de la langosta llanera, y *N. rileyi*, elegido para el control de *S. frugiperda*.

Considerando los criterios biológicos descritos, se escogieron los aislamientos Bv056 (*B. bassiana*) y Pc013 (*Isaria fumosorosea*), ya que producen mortalidades superiores al 92%, y VI026 (*L. lecanii*), por producir la mayor mortalidad en el menor tiempo (Espinel et al., 2009).

Adicionalmente, estos aislamientos presentaron características ecofisiológicas adecuadas y aspectos tecnológicos favorables, ya que produjeron una elevada cantidad de conidios en medios de cultivo simples y mostraron facilidad para separar los conidios del medio de cultivo.

A pesar de contar con tres aislamientos promisorios para el control de *B. tabaci*, para los estudios posteriores de desarrollo de un bioplaguicida se seleccionó el aislamiento VI026 de *L. lecanii*, por tener una alta actividad biocontroladora demostrada contra ambas moscas blancas, teniendo en cuenta que en algunas zonas del país se pueden encontrar ambas especies de plaga en la misma zona y cultivo (Espinel, Lozano, Villamizar, & Grijalba, 2008; Espinel, Torres, Grijalba, Villamizar, & Cotes, 2008; Grijalba, Villamizar, & Cotes, 2009; Villamizar, Grijalba, Zuluaga, Gómez, & Cotes, 2009) (figuras 11.7c y 11.10).

Dado que uno de los aspectos que se deben considerar en el desarrollo de bioplaguicidas es la determinación de su compatibilidad con otros agentes de control que puedan ser aplicados junto con el bioplaguicida en una estrategia de manejo integrado de plagas (MIP), se estudió el efecto de *L. lecanii* VI026 en el parasitoide *Amitus fuscipennis* (Pachón, & Cotes, 1997) y en el depredador *Delphastus pusillus* (Pérez, García, & Cotes, 2007, 2008), y se demostró que, aunque hubo un leve efecto en la reducción de estos enemigos naturales o de su actividad, este hongo puede ser usado dentro de un programa de manejo que involucre el uso de uno o varios de estos insectos benéficos.

Teniendo en cuenta las características presentadas por *L. lecanii* VI026, se desarrolló el bioplaguicida Lecabiol® (Cotes et al., 2009), que cuenta con registro de venta y que fue formulado con protectores de luz UVB, dada la susceptibilidad del hongo a esta radiación.

## Selección de un granulovirus para el control de la polilla guatemalteca de la papa, *Tecia solanivora*

Uno de los principales problemas del cultivo de la papa en Colombia es la polilla guatemalteca, *T. solanivora*, que causa daños en campo de hasta el 43,3%, y durante el almacenamiento de los tubérculos, de hasta el 37,5% (Arias, Jaramillo, Arévalo, Rocha, & Muñoz, 1996; Niño, 2004).

Para su control biológico en condiciones de almacenamiento, AGROSAVIA desarrolló un bioplaguicida denominado Baculovirus Corpoica®, a base de un granulovirus originario en el Perú, el único registrado en Colombia.

Sin embargo, con el ánimo de disponer de aislamientos nativos de baculovirus, se hizo un muestreo de larvas de *T. solanivora* colectadas en 19 municipios, localizados en los cinco departamentos productores de papa del país, y se obtuvieron 377 muestras. Mediante microscopía óptica de campo oscuro, se determinaron como positivas para una posible infección por granulovirus 9 muestras de Cundinamarca, 20 de Norte de Santander, 15 de Boyacá, 26 de Nariño y 34 de Antioquia.

Estas muestras presentaron puntos blancos, brillantes y titilantes, similares a los observados en una cepa de referencia del Perú. Las 104 que fueron positivas en la evaluación en el microscopio fueron evaluadas en un bioensayo en el que se infectaron larvas de primer instar de *T. solanivora*, con el fin de reproducir los signos y síntomas de la enfermedad. De las 104 muestras propagadas, solamente cinco presentaron una reproducción contundente de síntomas y signos de la enfermedad (VG001, VG002, VG003, VG004 y VG005).

Por otra parte, se comparó el efecto de la infección viral de estos aislamientos en el desarrollo larval de *T. solanivora* y de *Phthorimaea operculella*, y se observó una alteración significativa en su duración (Cuartas et al., 2009). Estos virus fueron purificados e identificados a través de microscopía electrónica y técnicas inmunológicas y moleculares.

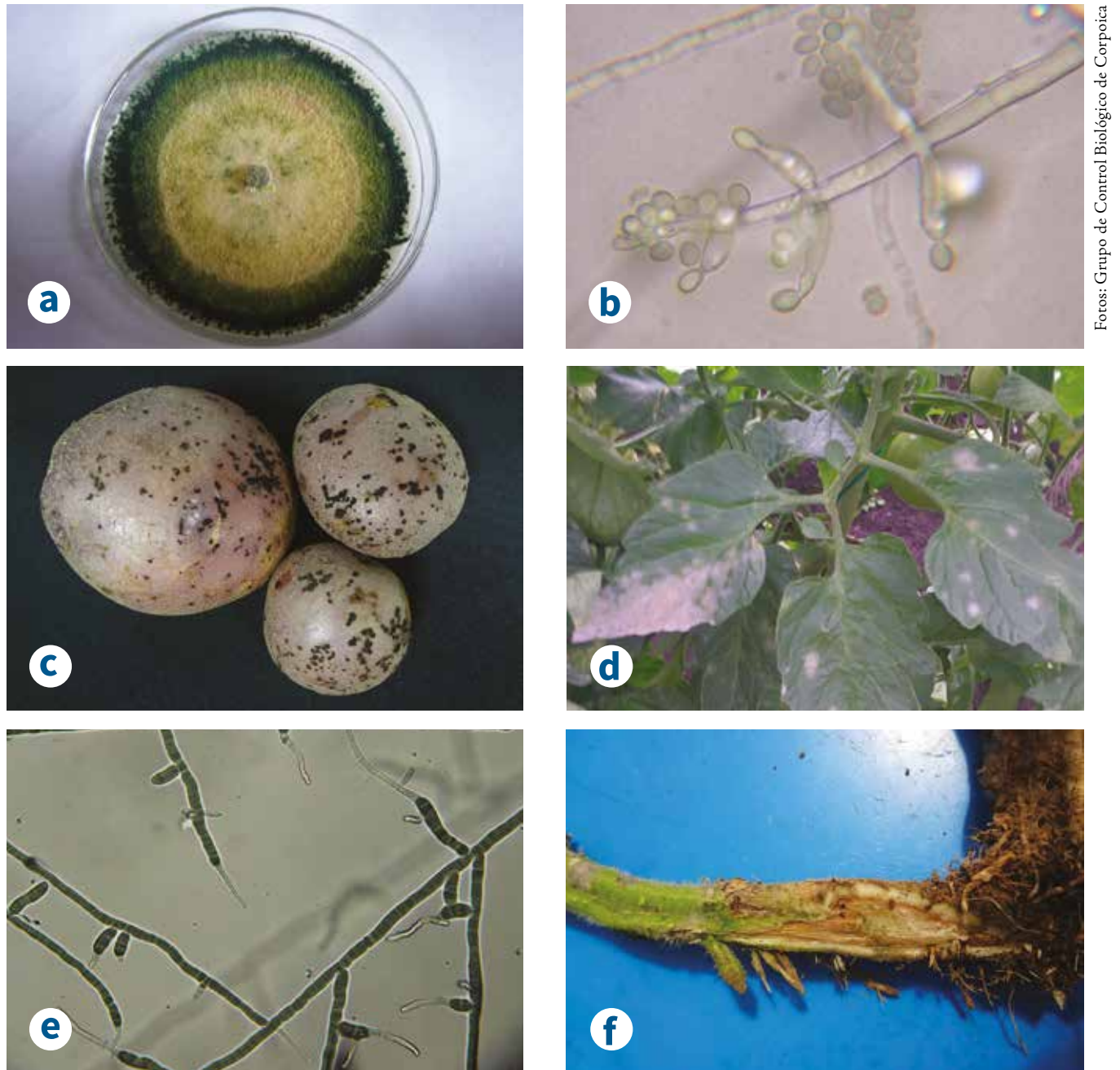
El análisis mediante patrones de restricción del ADN reveló la presencia de tres variantes genotípicas (Espinel-Correal et al., 2010; Léry et al., 2008).

Al cuantificar la producción de partículas virales por miligramo de tejido de la larva de *T. solanivora* infectada, no se encontraron diferencias entre los cinco aislamientos nativos, los cuales presentaron una producción promedio de  $4 \times 10^7$  cuerpos de inclusión cl/mg de tejido. Sin embargo, al comparar la actividad biocontroladora de los aislamientos, dos de ellos alcanzaron la mayor mortalidad (100%).



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.8.** Diferentes especies de levaduras utilizadas para el control biológico del moho gris producido por *B. cinerea*. a. Características macroscópicas de las levaduras; b. Síntomas causados por *B. cinerea* en pétalos de rosa; c. Síntomas causados por *B. cinerea* en mora.



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.9.** *Trichoderma koningiopsis* seleccionada para el control biológico de patógenos foliares y del suelo. a. Características macroscópicas; b. Características microscópicas; c. Patógeno *R. solani* en estado de esclerocios en tubérculo de papa; d. Mildeo polvoso en tomate; e. Aspecto microscópico del patógeno *R. solani*; f. Marchitamiento producido por *F. oxysporum* en tomate.

No obstante, al determinar las concentraciones letales del virus, se seleccionó el aislamiento VG003 (Cuartas et al., 2009) para desarrollar un bioplaguicida. Con este se desarrollaron dos prototipos, formulados como un granulado dispersable (WG) y un concentrado emulsionable (EC), y ambos contienen protectores de luz ultravioleta, dada la susceptibilidad del virus a esta radiación (Chaparro, Espinel, Cotes, & Villamizar,

2010; Quiroga, Gómez, & Villamizar, 2011) (figuras 11.7d y 11.11). Teniendo en cuenta que, además de su alta actividad biocontroladora contra *T. solanivora* y *P. operculella*, el granulovirus VG003 ha demostrado un gran potencial para el control de *Tuta absoluta* (Gómez-Valderrama et al., 2017), estos prototipos de producto podrían ser usados contra estas tres especies de Gelechiidae en condiciones de campo.



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.10.** Selección de un entomopatógeno para el control de las moscas blancas. a. Mosca blanca infectada por *L. lecanii*; b. *T. vaporariorum* sobre hojas de tomate; c. Síntoma viral en hojas afectadas por *T. vaporariorum* en tomate.



Fotos: Grupo de Control Biológico de Corpoica

**Figura 11.11.** Control biológico de la polilla guatemalteca de la papa con baculovirus. a. Papa infestada por *T. solanivora*; b. Aspecto microscópico del granulovirus seleccionado; c. Larvas de color blanquecino y con reducido crecimiento, debido al efecto de baculovirus; d. Producto registrado para el control de *T. solanivora* en almacenamiento.

## Biocomes: consorcio para el desarrollo de nuevos bioplaguicidas en Europa

Teniendo en cuenta la reducida disponibilidad de bioplaguicidas para implementar programas MIP como un enfoque importante para reducir la dependencia del uso de plaguicidas, se ha destacado el uso del control biológico, junto con métodos físicos, culturales y otros no químicos (Directiva 2009/128/CE).

Dado que no se dispone de alternativas de control biológico contra muchos insectos plaga y patógenos limitantes que causan grandes pérdidas económicas en la agricultura y la silvicultura, la Unión Europea (UE) decidió estimular el desarrollo de productos de control biológico, mediante la cofinanciación del proyecto Biocomes.

El proyecto inició el primero de diciembre de 2013, terminó el 30 de noviembre de 2017 y contó con una contribución de € 8.997.264 de la UE, y un presupuesto total de € 12.086.533. El consorcio estuvo integrado por 13 socios industriales y 14 instituciones de investigación del mismo número de países, quienes trabajaron mancomunadamente en el desarrollo de nuevos bioplaguicidas microbianos (Biocomes, 2014).

Al final de este proyecto, se espera que los socios de Biocomes hayan desarrollado 11 nuevos bioplaguicidas para controlar una serie de insectos plaga y

de enfermedades importantes en la agricultura, la horticultura y la silvicultura. Además, desarrollarán dos nuevas tecnologías para mejorar la producción de nematodos y virus entomopatógenos.

Algunos de los bioplaguicidas estuvieron disponibles a finales de 2017 y otros estarán listos para ser registrados y estar disponibles en el mercado a partir de entonces. Los principales insectos objeto de desarrollo son la polilla gitana (*Lymantria dispar*), el gorgojo del pino (*Hylobius abietis*), el minador de la hoja del tomate (*T. absoluta*), la mosca blanca, los áfidos de los cultivos de árboles frutales y la polilla de la col (*Mamestra brassicae*).

Por otro lado, los principales fitopatógenos objeto de control fueron los causantes de volcamiento (*damping-off*) en viveros forestales (*Fusarium* spp., *Phytophthora* spp., *Rhizoctonia* spp. y *Pythium* spp.); patógenos del suelo que afectan la colza y cereales; *Monilinia* spp., que afecta frutos de hueso, y el oídio de los cereales (*Blumeria graminis*) (Biocomes, 2014).

### Selección de microorganismos biocontroladores de *Blumeria graminis*

*B. graminis* es un patógeno biótrofo que causa el mildew polvoso en gramíneas, incluyendo trigo y cebada (figura 11.12), algunos de los principales cultivos a nivel mundial (Organización de las Naciones



Foto: Jürgen Köhl

**Figura 11.12.** Síntomas del mildew polvoso de las gramíneas, causado por *B. graminis* en trigo.

Unidas para la Alimentación y la Agricultura [FAO], 2015). Es considerado el sexto hongo fitopatógeno de mayor importancia (Dean et al., 2012), ya que la enfermedad es destructiva en todo el mundo, pues en climas favorables afecta toda la superficie foliar y causa la marchitez de las hojas, lo que resulta en pérdidas severas de rendimiento (Liu et al., 2012).

El proyecto, liderado por la Universidad de Wageningen, es parte del consorcio Biocomes, tuvo como objetivo desarrollar una solución tecnológica para el control de esta enfermedad e integra también a Agro Plantarum, GAB Consulting, Sekem Energy y Bayer CropScience. Para su desarrollo, en 2014 se colectaron muestras de hojas en cultivos de cereales, pastos y otras especies de plantas afectadas por mildew polvoso, y se obtuvieron 504, provenientes de los Países Bajos, Alemania y Suecia.

De estas muestras se obtuvieron 1.237 aislamientos de hongos a partir de pústulas, y 862 de ellos fueron seleccionados con base en los criterios de habilidad para su producción masiva: seguridad, tolerancia al frío y a la sequía y resistencia a luz UVB. Se eligieron los hongos capaces de producir  $1 \times 10^5$  conidios por caja de Petri, que no crecieran a 36 °C, con capacidad de germinar y crecer a 5 °C, los que germinaron

y crecieron a -7 mPa y -13 mPa ( $A_w$ : 0,95 y  $A_w$ : 0,91) y los tolerantes a luz UVB, los cuales pudieron crecer después de una exposición de entre 1 W/m<sup>2</sup> y 4 W/m<sup>2</sup> en siete días.

Se identificaron molecularmente (ITS y TEF) 862 aislamientos, pertenecientes a 121 grupos taxonómicos, y entre ellos el 74% hacía parte de 20 de los grupos taxonómicos más comunes. Se encontró que el 84,9% (732) cumplieron todos los criterios, y correspondieron a 86 de los 121 grupos taxonómicos (Köhl, & Rijk, 2016).

En esta fase de premuestreo (*screening*) mediante minería de datos al analizar los 86 grupos taxonómicos seleccionados, se encontró que 25 de ellos eran potenciales patógenos, 11 podían ser productores de micotoxinas, uno era patógeno potencial de peces y ninguno estaba protegido por patentes (Köhl, & Rijk, 2016).

Al realizar un ensayo de eficacia en trigo cv. Julius, sembrado en materas, entre 185 aislamientos evaluados se seleccionaron 10, con los que se obtuvo el menor cubrimiento de las hojas con pústulas de *B. graminis*. Estos se estudiaron en ensayos de campo a pequeña escala en trigo (figura 11.13).



**Figura 11.13.** Del aislamiento a la selección de potenciales biocontroladores para el control del mildew polvoso de las gramíneas *B. graminis*.

Fuente: Elaboración propia

## Definición del valor de la tecnología

Los productos biotecnológicos como los bioplaguicidas deben representar una solución costoefectiva para un problema fitosanitario limitante. Para lograrlo, es necesario conocer el valor que tiene la tecnología para sus usuarios potenciales, desde la concepción de la idea hasta su efectiva implementación en condiciones de campo. Conseguirlo requiere el desarrollo de varias etapas, que se describen a continuación.

### Fase 1. Diseño de producto orientado hacia el mercado

Durante el diseño conceptual del producto y desde el inicio de la prueba de concepto, es muy importante incluir a los usuarios finales del futuro bioplaguicida en el centro del proceso de innovación. Se debe conocer al cliente potencial, comprender sus prácticas actuales, identificar las tecnologías competitivas existentes y futuras y proveer al equipo de desarrollo directrices sólidas para enfocar su programa de investigación y desarrollo en las características que debe tener el producto para ofrecer el mayor valor agregado a los usuarios finales de la tecnología.

En esta etapa se desarrolla una vigilancia tecnológica, que es un proceso sistemático y permanente de búsqueda, captación, recolección, análisis y difusión de información pública estratégica en el entorno de la organización, así como del seguimiento y análisis del entorno de los competidores.

También es importante hacer un ejercicio con la metodología Quick Look, para conocer de forma rápida el potencial comercial de cada proyecto de desarrollo de un nuevo bioplaguicida, desde aprender cómo describir la tecnología para alguien que no es experto hasta ver el potencial de mercado y sus recomendaciones para avanzar con el proceso de transferencia.

### Segmentación de mercado

No todos los posibles usuarios finales del bioplaguicida en desarrollo son iguales. Se diferencian en aspectos

como: la intensidad de las plagas (insectos o fitopatógenos), en función de la región y del clima; los métodos de producción; la microeconomía de las granjas; su nivel de integración en la cadena de valor; los perfiles socioeconómicos, las maneras en que toman decisiones para la adopción de nuevas tecnologías (adoptadores tempranos frente a seguidores), y muchos más.

En consecuencia, los diversos usuarios finales valorarán de modo diferente las mismas características de una oferta tecnológica. Algunos le atribuirán un mayor peso a la eficacia que a la seguridad, algunos productores exigen que el bioplaguicida pueda ser incorporado directamente en el flujo de trabajo específico de sus operaciones, y en otros prima la sensibilidad al precio del producto. Estas prioridades pueden ser percibidas de forma distinta por otros posibles usuarios de la tecnología.

Para captar la diversidad del mercado, los potenciales usuarios finales del bioplaguicida se agrupan en grupos homogéneos, llamados segmentos (Gavett, 2014). Un segmento de mercado incluye clientes que atribuirán el mismo valor a las características distintivas del futuro producto.

Por ejemplo, si el producto de biocontrol tiene cinco propiedades técnicas, es decir, 1, 2, 3, 4, 5, cada segmento de clientes podrá clasificar sus preferencias de diferente manera; por ejemplo, uno las priorizará como 2, 3, 1, 5, 4, y otro las catalogará como 3, 5, 4, 2, 1.

Con una segmentación de mercado, el equipo de investigadores encargados del desarrollo adquiere una comprensión más sutil de los problemas que el productor pretende abordar, y contará con una herramienta práctica para identificar las características importantes que el bioplaguicida debe tener.

### Panorama competitivo

El usuario final nunca evaluará el valor del futuro bioplaguicida en términos absolutos, sino en comparación con las otras opciones tecnológicas disponibles. Para ser adoptado por el mercado, es necesario que el valor creado por el nuevo bioplaguicida, me-

nos sus costos, sea superior al de la siguiente mejor alternativa de control a la cual el productor tiene acceso.

Por lo tanto, a partir de la fase 1, el equipo de desarrollo identificará y seleccionará las tecnologías con las que quiere competir, es decir, las mejores alternativas. Esta encuesta incluirá las tecnologías existentes, así como las que están en proceso de desarrollo y que probablemente estarán disponibles en el momento del lanzamiento del nuevo bioplaguicida.

La encuesta, además de abarcar la competencia del mismo tipo de bioplaguicidas, debe hacerlo también con las tecnologías alternativas, incluyendo las emergentes. Por último, es necesario considerar que el panorama competitivo también podría variar de un segmento de mercado a otro.

Cualquier tecnología tiene su propio ciclo de vida, con fases de iniciación, desarrollo, madurez y declive. Con este panorama competitivo, los desarrolladores del nuevo bioplaguicida evaluarán la ventana de oportunidad que tienen a su disposición para lanzar y explotar la tecnología.

## Diseño de producto impulsado por el mercado

Al final de la fase 1, el equipo de desarrollo debe tener una idea concreta del bioplaguicida por desarrollar, la cual considera todos los resultados obtenidos en la prueba de concepto.

Por lo tanto, este no solo debe incluir los elementos técnicos, sino también los segmentos de mercado objetivo seleccionados y las tecnologías competitivas con las que se va a comparar el nuevo bioplaguicida. En este punto se establece una estimación aproximada del valor del mercado potencial.

De forma similar a la formulación y validación experimental de hipótesis científicas y técnicas en la fase de viabilidad, al final de la prueba de concepto se elaboran hipótesis sobre la creación de valor para segmentos de mercado específicos, y ventajas diferenciales frente a las tecnologías competitivas. También estarán sujetas a un proceso de validación durante la fase de factibilidad.

## Fase 2. Factores del negocio: propuesta de valor para el cliente

En la fase de factibilidad, el diseño del bioplaguicida establecido al final de la fase de prueba de concepto se convierte en un prototipo en el cual se consideraron los elementos de valor para los segmentos de mercado objetivo y las características diferenciales frente a las mejores alternativas existentes.

### Elementos de valor

En esta etapa, las características técnicas del bioplaguicida en desarrollo, validadas en condiciones experimentales, se traducen en términos de beneficios para los segmentos de mercado objetivo, los cuales a su vez se traducen en valor económico, es decir, lo que valen en términos monetarios para los clientes (Anderson & Narus, 1999; Anderson, Narus, & Van Rossum, 2006).

La traducción de las características técnicas del bioplaguicida en valor para el cliente se ilustra mediante el siguiente ejemplo. Gracias a una mejora de la formulación, la duración de la actividad de un bioplaguicida se multiplica por un factor de 2. Como resultado, el número de aplicaciones del producto en campo se reduce de 6 a 3, con un ahorro de US\$60 por hectárea. En este caso, la característica técnica es el aumento de la duración de la actividad, el beneficio para el productor es una simplificación de la aplicación de campo y el valor es US\$60 por hectárea.

### Establecimiento de elementos de valor

La interacción directa del equipo de investigadores responsables del desarrollo del bioplaguicida con los clientes potenciales es un requisito previo para el establecimiento de la lista de elementos de valor del producto.

Se trata de un proceso de tres pasos: 1) el equipo de desarrollo presenta un primer conjunto de elementos de valor potencial de la oferta técnica, basado en información secundaria y en su conocimiento interno;

2) se elabora una cuidadosa selección de clientes potenciales, en función de la segmentación del mercado, y se les realizan entrevistas en profundidad para probar las hipótesis iniciales y recopilar posibles nuevos elementos; 3) sobre la base de la investigación de campo, se establece y valida la lista definitiva de elementos de valor.

En consecuencia, los elementos de valor del bioplaguicida en desarrollo se comparan con las mejores alternativas que se han seleccionado. Para cada elemento de valor y cada mejor alternativa siguiente, la posición del bioplaguicida se establece como igual, superior o inferior.

### Propuesta de valor

Al final de la fase 2, el equipo de desarrollo es capaz de sintetizar todos los elementos de valor que han demostrado ser viables en una propuesta, mediante una ecuación que resume todo el valor creado por las características del bioplaguicida, y resta todos los costos asociados a la compra del producto (en este momento se dispone de una estimación de los costos de producción) y el costo de las aplicaciones (equipos, número de aplicaciones y mano de obra involucrada, entre otros elementos).

La propuesta de valor se establece para cada segmento de mercado y se definen de forma objetiva las diferencias con las segundas mejores alternativas. En ese punto, esta propuesta del bioplaguicida permite ajustar el mercado potencial por segmentos (Anderson, & Narus, 1999; Anderson et al., 2006).

## Fase 3. Estrategia de mercadeo

Con la optimización y validación definitiva de las características del producto, incluyendo su eficacia, seguridad y costo, el equipo de desarrollo está en condiciones de decidir sobre la estrategia de comercialización para lanzar el bioplaguicida en el mercado.

El objetivo de una estrategia de mercadeo es doble: a) optimizar la adopción del bioplaguicida por el mercado, generando ventas a través de la entrega de

valor agregado a los usuarios finales, y b) obtener un retorno justo de la inversión hecha durante el desarrollo de la tecnología.

### Segmentación del mercado objetivo

Como se mencionó anteriormente, la propuesta de valor del bioplaguicida varía en función de los segmentos de mercado. Para algunos de ellos el producto podría entregar un valor mucho más alto que para otros, lo que conduce a mayores ingresos y, por lo tanto, a márgenes de ganancia que pueden ser más altos.

Sin embargo, los costos que implica promover y vender el bioplaguicida también varían en gran medida. Por ejemplo, si los clientes de un segmento dado están geográficamente dispersos, sin red de comunicación, el costo de alcanzarlos podría ser mayor que el requerido para llegar a un segmento consolidado y bien organizado. Además, la posición competitiva del bioplaguicida en los diferentes segmentos determinará la capacidad de captar diversos porcentajes del mercado.

Integrando los objetivos de volumen y beneficio, el mercado potencial por segmentos y los recursos disponibles, para el lanzamiento del producto se decide un enfoque dirigido a algunos segmentos específicos. Esta segmentación del mercado objetivo es un paso importante para maximizar la rapidez de la penetración del bioplaguicida en el mercado, concentrar los recursos donde más se justifique su inversión y optimizar la probabilidad de éxito.

### Estrategia de mercadeo

Una vez seleccionados los segmentos objetivo, la estrategia de mercadeo para cada uno de ellos se define a lo largo de cuatro líneas: 1) posicionamiento, 2) precio, 3) promoción y 4) lugar (Išoraitė, 2016).

El posicionamiento permite que la propuesta de valor para los clientes objetivo esté claramente establecida, así como los elementos diferenciales de la segunda mejor alternativa; el precio se determina teniendo en cuenta la elasticidad-precio en el segmento, el precio de las alternativas y el valor agregado. Por su parte, la

promoción se refiere a los medios de comunicación que se desplegarán, y el lugar alude a los canales de distribución para llevar los productos a los usuarios finales.

## Proyecciones financieras y plan de implementación

La estrategia de mercadeo conduce al desarrollo de las previsiones de ventas y a la evaluación de los costos operativos para el lanzamiento del bioplaguicida. Las proyecciones de los costos de producción, y eventualmente la definición del capital necesario para el proceso de fabricación, se integran con los costos operativos y de ventas, en un modelo financiero que es fundamental para optimizar el desempeño económico del proyecto. Con este propósito se realizan varias simulaciones del modelo (análisis de sensibilidad), para identificar los principales riesgos y factores de éxito (Samonas, 2015).

Al final de la fase 3, se elabora un plan de implementación detallado para el lanzamiento del bioplaguicida, acompañado de algunas medidas para mitigar los riesgos identificados.

## Fase 4. Entrada de negocios: entrega de valor

En la última fase, se implementa el plan definido para entregar el valor del bioplaguicida. En esta etapa, el equipo de desarrollo debe prestar atención a dos aspectos primordiales: 1) la documentación final sobre el valor entregado y 2) la selección del modelo de negocio óptimo.

## Documentación del valor entregado

En el mercadeo de empresa a empresa, las descripciones sencillas no son suficientes. Los clientes esperan que los proveedores demuestren inequívocamente el valor que entrega la oferta del producto, en las condiciones reales de sus operaciones y con sus propios criterios. Por lo tanto, en la cuarta fase, los desarrolladores de bioplaguicidas tienen que llevar a cabo ensayos de campo diferentes a los que se desarrollan para cumplir con los requisitos reglamentarios.

El objetivo de estos ensayos de campo es demostrar y cuantificar el impacto que la aplicación del bioplaguicida tiene en la microeconomía de las granjas de clientes objetivo. Estas pruebas son costosas y complejas, pues requieren una gran comprensión de los modelos económicos de los clientes.

## Selección del modelo de negocio óptimo

Existen diferentes opciones de modelo de negocio para el desarrollador de un bioplaguicida, como se da en el sector de la biotecnología, en el que un determinado producto puede pasar por diferentes empresas o entidades entre el inicio de la prueba de concepto y su comercialización, ya que puede involucrar centros de investigación públicos o privados y grandes corporaciones o multinacionales.

La regla del juego en esta cadena de valor consiste en que, en cada paso, el actor involucrado sea capaz de agregar valor a la tecnología y licenciarla hacia el siguiente actor, mientras se realiza un retorno de la inversión. Existen varios tipos de acuerdos entre dos actores de la cadena de valor, como contratos de investigación, codesarrollo, fabricación o acuerdos de servicios.

## Conclusiones

La selección de un agente de control biológico para el desarrollo de un bioplaguicida implica el cumplimiento de múltiples etapas, que incluyen el conocimiento del patógeno y la enfermedad que produce, o del insecto plaga y los daños que causa, además del estudio del biocontrolador, del cultivo objeto de control y de las interacciones entre estos y el medio ambiente.

También, en etapas tempranas, se debe realizar el estudio sobre el potencial de mercado del producto que se pretende desarrollar, lo cual exige un conocimiento profundo acerca del nivel tecnológico y socioeconómico de los productores a quienes se dirigirá la tecnología.

Por lo tanto, el desarrollo de bioplaguicidas no puede ser visto solo desde las disciplinas de la fitopatología o la entomología, sino que involucra un trabajo interdisciplinario, que debe tener como foco el valor que este nuevo producto representará para el cliente y para la sociedad.

## Agradecimientos

Los autores expresan sus agradecimientos a todo el grupo de trabajo de control biológico del Centro de Investigación Tibaitará de AGROSAVIA, por su contribución en el desarrollo de los proyectos que dieron origen a los bioplaguicidas mencionados en el presente capítulo.

La contribución de Jürgen Köhl fue respaldada por Biocomes, un proyecto financiado por la Comisión Europea (Subvención 612713).

## Referencias

- Anderson, J. C., & Narus, J. A. (1999). *Business Market Management: Understanding, Creating, and Delivering Value*. Englewood Cliffs, EE. UU.: Prentice-Hall.
- Anderson, J. C., Narus, J. A., & Van Rossum, W. (2006). Customer value propositions in business markets. *Harvard Business Review*, 84(3), 1-4.
- Arias, J., Jaramillo, J., Arévalo, E., Rocha, N., & Muñoz, L. (1996). *Evaluación de la incidencia y severidad del daño de la polilla gigante de la papa Tecia solanivora en el departamento de Antioquia* (Cartilla divulgativa). Bogotá, Colombia: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica).
- Beltrán, C., Cotes, A. M., & París, A. (2007). Selection of isolates of *Trichoderma* spp. with biocontrol activity over *Rhizoctonia solani* in potato. *IOBC-WPRS Bulletin*, 30(6), 55-58.
- Beltrán, C., Moreno, C. A., Blanco, P., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2012). Biological control of *Rhizoctonia solani* and growth promotion activity of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034 formulations in potato (*Solanum tuberosum*). *IOBC-WPRS Bulletin*, 78, 223-227.
- Biocomes. (2014). *Biocomes: new biological control products for farmers and foresters*. Recuperado de <http://www.biocomes.eu/news-article/biocomes-new-biological-control-products-farmers-foresters/>.
- Boland, G. J. (2004). Fungal viruses, hypovirulence, and biological control of *Sclerotinia* species. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26(1), 6-18. doi:10.1080/07060660409507107.
- Bosa, C. F., & Cotes, A. M. (1997). Evaluación de la actividad insecticida de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* contra *Spodoptera frugiperda*. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(3/4), 107-112.
- Botero, A. (2016). *Effect of three Trichoderma species on clubroot disease in cabbage* (tesis de doctorado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Brimner, T. A., & Boland, G. J. (2003). A review of the non-target effects of fungi used to biologically control plant diseases. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 100(1), 3-16. doi:10.1016/S0167-8809(03)00200-7.
- Butt, T. M., & Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. En A. Navon, & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (pp. 141-195). Wallingford, Reino Unido: CAB International. doi:10.1079/9780851994222.0141.
- Byrne, D. N., Bellows T. S., Jr., & Parrella, M. P. (1990). Whiteflies in agricultural systems. En D. Gerling (Ed.), *Whiteflies: their bionomics, pest status and management* (pp. 227-251). Andover, Reino Unido: Intercept.
- Chaparro, M., Espinel, C. C., Cotes, A. M. P., & Villamizar, L. R. (2010). Fotoestabilidad y actividad insecticida de dos formulaciones de granulovirus sobre larvas de *Tecia solanivora*. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(1), 25-30.
- Common Access to Biological Resources and Information (Cabri). (2017). *Cabri Guidelines. Procedures manual*. Recuperado de [http://www.cabri.org/guidelines/procedures/procedures\\_manual.html](http://www.cabri.org/guidelines/procedures/procedures_manual.html).
- Cotes, A., Cárdenas, A., & Pinzón, H. (2001). Effect of seed priming in the presence of *Trichoderma koningii* on seed and seedling disease induced in tomato by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *IOBC-WPRS Bulletin*, 24(3), 259-264.
- Cotes, A. M., Espinel, C., Villamizar, L., Garzón, I., Lozano, M., & López-Ávila, A. (2009). Biopesticide based on *Lecanicillium lecanii* developed for whiteflies control. *IOBC-WPRS Bulletin*, 45, 263-266.
- Cotes, A. M., Lepoivre, P., & Semal, J. (1996). Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. *European Journal of Plant Pathology*, 102(5), 497-506. doi:10.1007/BF01877144.

- Cotes, A. M., Moreno, C. A., Molano, L. F., Villamizar, L., & Piedrahita, W. (2007). Prospects for integrated management of *Sclerotinia sclerotiorum* in lettuce. *IOBC-WPRS Bulletin*, 30(6/2), 391-394.
- Cotes, A. M., Sastoque, L., Rada, L., Beltrán, C., González, C., Osorio, D., & Cepero de García, M. C. (2012). Evaluation of naturally occurring *Pseudomonas* spp. and a biopesticide based on *Trichoderma koningiopsis* as potential biological control agents of *Olpidium virulentus* in figue. *IOBC-WPRS Bulletin*, 78, 135-139.
- Cotes, A. M., Zapata, J., Díaz, A., García, M., Medina, C., Cristancho, D., ... Uribe, D. (2011). Selección de levaduras filosféricas con potencial para el control biológico de *Botrytis cinerea*. *Fitopatología Colombiana*, 35(2), 51-56.
- Cuarteras, P., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. M. (2009). Infección de granulovirus nativos sobre *Tecia solanivora* y *Phthorimaea operculella* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2), 122-130.
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... Ellis, J. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430.
- Deshpande, M. V., Chandele, A. G., Nahar, P., Hadapad, A., Patil, G., Ghormade, V., ... Tuor, U. (2003). Entomopathogenic fungi: Mycoinsecticides useful against lepidopteran pest in pulses. *IOBC-WPRS Bulletin*, 26(1), 27-30.
- Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). (2017). *German Collection of Microorganisms and Cell Cultures*. Recuperado de <http://www.dsmz.de>.
- Díaz, A., Smith, A., Mesa, P., Zapata, J., Caviedes, D., & Cotes, A. M. (2013). Control of *Fusarium* wilt in cape gooseberry by *Trichoderma koningiopsis* and PGR. *IOBC-WPRS Bulletin*, 86, 89-94.
- Environmental Protection Agency (EPA). (2017). *Pesticides*. Recuperado de <https://www.epa.gov/pesticides>.
- Espinel-Correal, C., Léry, X., Villamizar, L., Gómez, J., Zeddám, J. L., Cotes, A. M., & López-Ferber, M. (2010). Genetic and biological analysis of Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Applied and Environmental Microbiology*, 76(22), 7617-7625.
- Espinel-Correal, C., López-Ferber, M., Zeddám, J., Villamizar, L., Gómez, L., Cotes, A. M., & Léry, X. (2012). Experimental mixtures of *Phthorimaea operculella* granulovirus isolates provide high biological efficacy on both *Phthorimaea operculella* and *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, 110(3), 375-381. doi: 10.1016/j.jip.2012.04.012.
- Espinel, C., Ebratt, E., & Cotes, A. (1998). Evaluación de cepas nativas de *Metarhizium anisopliae* para el control biológico de la langosta llanera *Rhammatocerus schistocercoides* (Orthoptera: Acrididae). *Revista Colombiana de Entomología*, 24(1-2), 1-6.
- Espinel, C., Lozano, M. D., Villamizar, L., & Grijalba, E. (2008). IPM strategy for the control of *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) on melon and tomato. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 163-168.
- Espinel, C., Torres, L., & Cotes, A. (2009). Efecto de hongos entomopatógenos sobre estados de desarrollo de *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 18-21.
- Espinel, C., Torres, L., Grijalba, E., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2008). Preformulados para control de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Hemiptera: Aleyrodidae) en condiciones de laboratorio. *Revista Colombiana de Entomología*, 34(1), 22-27.
- García, J. (1996). *Evaluación de cepas nativas de Verticillium lecanii* (Zimm.) Viegas en el control de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) (Tesis de pregrado). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Gavett, G. (2014). *What you need to know about segmentation*. Recuperado de <https://hbr.org/2014/07/what-you-need-to-know-about-segmentation>.
- Gómez-Valderrama, J., Barrera, G., López-Ferber, M., Belaich, M., Ghiringhelli, P. D., & Villamizar, L. (2017). Potential of betabaculoviruses to control the tomato leafminer *Tuta absoluta* (Meyrick). *Journal of Applied Entomology*, 142(1-2), 67-77. doi:10.1111/jen.12406
- Gómez, J., Villamizar, L., Espinel, C., & Cotes, A. M. (2009). Comparación de la eficacia y la productividad de tres granulovirus nativos sobre larvas de *Tecia solanivora* (Povolny) (Lepidoptera: Gelechiidae). *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 10(2), 152-158. Recuperado de <http://revista.corpoica.org.co/index.php/revista/article/download/137/140>.
- Grijalba, E., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2009). Evaluación de la estabilidad de *Paecilomyces* sp. y *Beauveria bassiana* frente a la radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1), 1-6.
- Hadziavdic, K., Lekang, K., Lanzen, A., Jonassen, I., Thompson, E. M., & Troedsson, C. (2014). Characterization of the 18S rRNA gene for designing universal eukaryote specific primers. *PloS One*, 9(2), e87624. doi:10.1371/journal.pone.0087624.
- Hajek, A. E., & Goettel, M. S. (2000). Guidelines for evaluating effects of entomopathogens on non-target organisms. En L. A. Lacey & H. K. Kaya (Eds.), *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology* (pp. 816-833). Dordrecht, Países Bajos: Kluwer Academic Publishers.
- Hubálek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*, 46(3), 205-229. doi:10.1016/S0011-2240(03)00046-4.

- Išoraitė, M. (2016). Marketing Mix Theoretical Aspects. *International Journal of Research Granthaalayah*, 4(6), 25-37.
- Jacqmin, B., Cotes, A. M., Lepoivre, P., & Semal, J. (1993). Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. *Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen*, 58(3b), 1321-1328.
- Köhl, J., Postma, J., Nicot, P., Ruocco, M., & Blum, B. (2011). Stepwise screening of microorganisms for commercial use in biological control of plant-pathogenic fungi and bacteria. *Biological Control*, 57(1), 1-12.
- Kohl, J., & Rijk, N. (2016). The Biocomes consortium, a model private-public partnership project. En *Proceedings of the 12th Brazilian meeting of biological control of plant disease* (pp. 63-75). Lavras, Brasil: Universidade Federal de Lavras.
- Léry, X., Villamizar, L., Espinel, C., Zeddani, J.-L., Cotes, A. M., & López-Ferber, M. (2008). Analysis of several Colombian *Phthorimaea operculella* granulovirus isolated from *Tecia solanivora*: detection of a new variable region in the PhopGV genome. *IOBC-WPRS Bulletin*, 31, 83.
- Liu, N., Gong, G., Zhang, M., Zhou, Y., Chen, Z., Yang, J., ...Liu, K. (2012). Over-summering of wheat powdery mildew in Sichuan Province, China. *Crop Protection*, 34, 112-118.
- Mesa, P. (2017). *Efecto de microorganismos biocontroladores y aditivos orgánicos sobre el camanduleo de la papa ocasionado por Spongopora subterranea f. sp. subterranea* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Colombia.
- Moreno, C. A., Castillo, F., González, A., Bernal, D., Jaimes, Y., Chaparro, M., ... Cotes, A. M. (2009). Biological and molecular characterization of the response of tomato plants treated with *Trichoderma koningiopsis*. *Physiological and Molecular Pathology*, 74(2), 111-120. doi:10.1016/j.pmpp.2009.10.001.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; a review. *Journal of Microbiological Methods*, 66(2), 183-193. doi:10.1016/j.mimet.2006.02.017.
- Nahar, P., Ghormade, V., & Deshpande, M. V. (2004). The extracellular constitutive production of chitin deacetylase in *Metarhizium anisopliae*: a possible edge to entomopathogenic fungi in the biological control of insect fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(2), 80-88. doi:10.1016/j.jip.2003.11.006.
- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655-670.
- Navon, A. (2000). Bioassays of *Bacillus thuringiensis* products used against agricultural pests. En A. Navon, & K. R. S. Ascher (Eds.), *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes* (pp. 1-24). Wallingford, Reino Unido: Centre for Agriculture and Biosciences International (CABI).
- Niño, L. (2004). Revisión sobre la polilla de la papa *Tecia solanivora* en Centro y Suramérica. *Suplemento Revista Latinoamericana de la Papa*, 1, 4-21.
- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). (2015). *Statistical Pocketbook 2015*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-i4691e.pdf>.
- Pachón, M., & Cotes, A. M. (1997). Efecto de *Verticillium lecanii* entomopatógeno de la mosca blanca de los invernaderos *Trialeurodes vaporariorum* (Westwood) sobre la actividad parasítica de *Amitus fuscipennis* en un cultivo de frijol *Phaseolus vulgaris*. *Revista Colombiana de Entomología*, 23(3-4), 171-175.
- Parlamento Europeo, & Consejo de la Unión Europea. (2009). *Regulation (EC) N.º 1107/2009 of the European Parliament and of the Council of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC*. Recuperado de [https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/information/2009\\_1107\\_EU-e.pdf](https://www.eppo.int/PPPRODUCTS/information/2009_1107_EU-e.pdf).
- Pérez, R., García, J., & Cotes, A. M. (2007). Efecto de un bioplaguicida sobre algunos parámetros poblacionales del depredador *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 33(2), 116-123.
- Pérez, R., García, J., & Cotes, A. M. (2008). Efecto de un bioplaguicida sobre la actividad depredadora de *Delphastus pusillus* (Coleoptera: Coccinellidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 34(2), 176-181.
- Pliego, C., Cazorla, F. M., González-Sánchez, M. A., Pérez-Jiménez, R. M., De Vicente, A., & Ramos, C. (2007).

- Selection for biocontrol bacteria antagonistic toward *Rosellinia necatrix* by enrichment of competitive avocado root tip colonizers. *Research in Microbiology*, 158(5), 463-470. doi:10.1016/j.resmic.2007.02.011.
- Quiroga, I., Gómez, M., & Villamizar, L. (2011). Estabilidad de formulaciones a base de granulovirus para controlar *Tecia solanivora* (Lepidoptera: Gelechiidae) en campo. *Revista Colombiana de Entomología*, 37(1), 27-35.
- Reddy, M., Hynes, R., & Lazarovits, G. (1994). Relationship between in vitro growth inhibition of pathogens and suppression of preemergence damping-off and postemergence root rot of white bean seedlings in the greenhouse by bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 40(2), 113-119.
- Rocha, R., Da Luz, D. E., Engels, C., Pileggi, S. A. V., De Souza, D., Matiello, R. R., & Pileggi, M. (2009). Selection of endophytic fungi from comfrey (*Symphytum officinale* L.) for in vitro biological control of the phytopathogen *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.). *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(1), 73-78.
- Roselyne, L. (2005). *Intraguild interactions of the greenhouse whitefly natural enemies, predator Dicyphus hesperus, pathogen Beauveria bassiana and parasitoid Encarsia formosa* (Tesis de doctorado). Université Laval, Québec, Canadá.
- Roychowdhury, D., Paul, M., & Banerjee, S. (2014). A review on the effects of biofertilizers and biopesticides on rice and tea cultivation and productivity. *International Journal of Engineering, Science and Technology*, 2(8), 96-106.
- Samonas, M. (2015). *Financial Forecasting, Analysis and Modelling: A Framework for Long-Term Forecasting*. Nueva York, EE. UU.: John Wiley & Sons.
- Santos, A., García, M., Cotes, A. M., & Villamizar, L. (2012). The effect of the formulation on the shelf-life of biopesticides based on Colombian isolates of *Trichoderma koningiopsis* Th003 and *Trichoderma asperellum* Th034. *Revista Iberoamericana de Micología*, 29(3), 150-156.
- Sharifi-Tehrani, A., Zala, M., Natsch, A., Moënne-Loccoz, Y., & Défago, G. (1998). Biocontrol of soil-borne fungal plant diseases by 2,4-diacetylphloroglucinol producing fluorescent pseudomonads with different restriction profiles of amplified 16S rDNA. *European Journal of Plant Pathology*, 104(7), 631-643. doi:10.1023/A:1008672104562.
- Smith, A., Beltrán, C., Kusunoki, M., Cores, A. M., Motohashi, K., Kondo, T., & Deguchi, M. (2013). Diversity of soil-dwelling *Trichoderma* in Colombia and their potential as biocontrol agents against the phytopathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. *Journal of General Plant Pathology*, 79(1), 74-85. doi:10.1007/s10327-012-0419-1.
- Suhandono, S., Kusumawardhani, M. K., & Aditiawati, P. (2016). Isolation and molecular identification of endophytic bacteria from rambutan fruits (*Nephelium lappaceum* L.) cultivar Binjai. *Hayati Journal of Biosciences*, 23(1), 39-44. doi:10.1016/j.hjb.2016.01.005.
- Van Baarlen, P., Woltering, E. J., Staats, M., & Van Kan, J. A. L. (2007). Histochemical and genetic analysis of host and non-host interactions of *Arabidopsis* with three *Botrytis* species: an important role for cell death control. *Molecular Plant Pathology*, 8(1), 41-54. doi:10.1111/j.1364-3703.2006.00367.x.
- Van Lenteren, J. C., Bolckmans, K., Köhl, J., Ravensberg, W. J., & Urbaneja, A. (2017). Biological control using invertebrates and microorganisms: plenty of new opportunities. *BioControl*, 63(1), 39-59. doi:10.1007/s10526-017-9801-4.
- Villamizar, L., Grijalba, E., Zuluaga, M., Gómez, M., & Cotes, A. M. (2009). Evaluation of some parameters influencing the activity of a fungal biocontrol agent used for *Bemisia tabaci* control. *IOBC-WPRS Bulletin*, 45, 327-330.
- Zapata, J., Acosta, C., Díaz, A., Villamizar, L., & Cotes, A. M. (2011). Characterization of *Rhodotorula glutinis* and *Pichia onychis* isolates with potential as biopesticides for controlling *Botrytis cinerea*. *Acta Horticulturae*, 905, 155-160.
- Zapata, J., Villamizar, L., Díaz, A., Uribe, L., Bolaños, C., Gómez, M., & Cotes, A. M. (2013). Development of a biopesticide prototype based on the yeast *Rhodotorula glutinis* Lv316 for controlling *Botrytis cinerea* in blackberry. *IOBC-WPRS Bulletin*, 86, 263-269.
- Zapata, Y., Díaz, A., Grijalba, E., Rodríguez, F., Elad, Y., & Cotes, A. M. (2016). Phyllosphere yeasts with potential for biological control of *Botrytis cinerea* in rose. *Acta Horticulturae*, 1144, 77-84.